

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 440**

21 Número de solicitud: 201231427

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

14.09.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.06.2014

Fecha de la concesión:

24.03.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

31.03.2015

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

Serrano nº 117

28006 Madrid (Madrid) ES y

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (50.0%)

72 Inventor/es:

VELASCO SAMPEDRO, Eladio Andrés;

ACEDO BÉCARES, Alberto y

DÍEZ GÓMEZ, Beatriz

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **Plásmido pSAD para ensayos funcionales de splicing**

57 Resumen:

Plásmido pSAD para ensayos funcionales de splicing. La presente invención se refiere a un vector génico útil para ensayos funcionales de splicing obtenido a partir del plásmido pSPL3b, que comprende: una delección del intrón de pSPL3b; una sustitución del MCS de pSPL3b por un casete lacZ sin sitio críptico aceptor de splicing; una mutación de fortalecimiento del sitio aceptor de splicing de pSPL3b; una mutación de inhabilitación de al menos una diana de restricción de pSPL3b; y consiste preferentemente en SEQ ID No: 79. Es asimismo objeto de la invención, un procedimiento de obtención del vector anterior. La invención también se refiere a un minigen que comprende dicho vector con una secuencia nucleotídica clonada en el MCS de lacZ, así como una célula que comprende un vector o minigen de los anteriores. Además, también hace referencia al uso del vector o minigen en ensayos funcionales de splicing, protegiendo también un método para este tipo de ensayos.

ES 2 470 440 B1

DESCRIPCIÓN

PLÁSMIDO pSAD PARA ENSAYOS FUNCIONALES DE SPLICING

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra dentro del campo de la Biología Molecular y Biomedicina. En concreto, la presente invención se refiere a vectores plasmídicos para la realización de ensayos funcionales de splicing, que son de utilidad para la identificación de mutaciones deletéreas de *splicing* en genes de predisposición causantes de enfermedad, pudiendo servir como herramienta para el diagnóstico molecular de cáncer familiar y, en general, de todas las enfermedades hereditarias, y para el conocimiento básico de los mecanismos reguladores de esta etapa esencial de la expresión génica.

Estado de la técnica anterior

El procesamiento del pre-ARNm o "*splicing*" es una etapa esencial en la expresión de los genes eucariotas, en el cual se eliminan los intrones y se unen secuencialmente los exones (codificantes para proteína). De los aproximadamente 20.000 genes del genoma humano, alrededor del 90% de los transcritos primarios presentan *splicing* alternativo dando lugar a múltiples isoformas proteicas (Kalsotra and Cooper, 2011). El *splicing* alternativo es un mecanismo crucial para el control de la expresión génica y la generación de diversidad en el proteoma. Por ello, su regulación es extraordinariamente precisa determinando cuándo y dónde se produce una isoforma determinada. La simple regla general ["sitio donador (GU)-punto de ramificación (A)-tracto de pirimidinas-sitio aceptor (AG)"] no basta para explicar una regulación tan específica del *splicing* alternativo. Este proceso está controlado por una serie de complejos ribonucleoproteicos, factores de *splicing* y otras secuencias exónicas e intrónicas en cis denominadas enhancers y silenciadores de *splicing* (Cartegni et al., 2002). A estos motivos se unen factores de *splicing* específicos (básicamente proteínas SR-enhancers y hnRNP-silenciadores). Los enhancers fomentan la inclusión del exón en el ARNm maduro mediante el reclutamiento de la maquinaria de *splicing*, mientras que los silenciadores reprimen la inclusión del exón. Las proteínas hnRNPs y SR son factores esenciales para el *splicing* constitutivo y alternativo específico de tejido. Cualquier mutación que afecte a cualquiera de las secuencias reguladoras mencionadas puede afectar el *splicing* y estar asociada a una enfermedad.

Por otro lado, en las enfermedades hereditarias generalmente se consideran mutaciones causantes de enfermedad aquellas que afectan a la proteína, ya sea truncándola (mutaciones *nonsense* y *frameshift*) o alterando su función (mutaciones de cambio de amino ácido o *missense*), o aquellas que alteran el procesamiento del ARNm o *splicing*. Recientemente ha tomado especial relevancia en Biomedicina la correlación entre *splicing* aberrante y enfermedad como consecuencia de la lista creciente de mutaciones patogénicas ligadas a un *splicing* defectuoso de genes responsables de enfermedades hereditarias (Wang and Cooper, 2007). Un análisis bioinformático, estimaba que aproximadamente un 60% de las mutaciones potencialmente deletéreas podría afectar el mecanismo de *splicing* (Lopez-Bigas et al., 2005). Además de las mutaciones clásicas que afectan a los sitios donador y aceptor, cabe señalar que la eliminación o alteración de enhancers y silenciadores puede afectar el proceso de *splicing*. Por ello, cualquier variante de ADN, considerada a priori como un mero polimorfismo (p.e. variantes sinónimas), debe ser revisada por un posible efecto deletéreo a través del procesamiento del pre-ARNm. Precisamente, uno de los grandes problemas en la realización del Consejo Genético en enfermedades hereditarias es la detección en los pacientes de variantes de ADN de efecto clínico desconocido (UVs) cuya implicación en la enfermedad es desconocida. De hecho una gran fracción de las variantes detectadas en el rastreo de un gen de predisposición son de este tipo (hasta un 15% de las pacientes con cáncer de mama/ovario son portadoras de UVs), siendo necesaria su clasificación como meros polimorfismos o mutaciones patogénicas de cara a la activación de los protocolos de prevención y/o al establecimiento de terapias paliativas y/o curativas. Para estudiar el efecto de un cambio en el ADN sobre el *splicing* y su implicación en una enfermedad es necesario estudiar el ARN del paciente, que en muchas ocasiones no está disponible para el laboratorio de diagnóstico molecular. Es aquí donde entran en juego los plásmidos o vectores de exon trapping como el propuesto en esta patente. Estos vectores disponen de un "minigen" compuesto por un promotor eucariota, dos exones constitutivos y un intrón. Se clona el exón en estudio y las secuencias intrónicas flanqueantes dentro del intrón del vector en la orientación adecuada: "exón 1 vector – [intrón – sitio aceptor – exón en estudio – sitio donador – intrón] – exón 2 vector". Al introducir esta construcción, a la que llamamos minigen híbrido (plásmido reportero de *splicing* o *splicing reporter minigenes*), en células eucariotas humanas en cultivo (por ejemplo, células HeLa), se produce una reacción heteróloga de *splicing* entre los exones del vector y el exón en estudio, produciéndose un transcrito que contiene los dos exones constitutivos del vector de *splicing* y el exón clonado entre ambos. Para estudiar el efecto de cualquier mutación detectada en pacientes, bastará con generarla mediante un sencillo protocolo de mutagénesis dirigida sobre el minigen *wild type*, y ensayarla como se ha descrito arriba, de tal manera que estos plásmidos reporteros de *splicing* permiten realizar ensayos funcionales de *splicing* sin necesidad de ARN del paciente. No sólo eso, estos vectores son muy útiles para la investigación básica de los mecanismos reguladores del *splicing*, identificación de secuencias reguladoras y factores de *splicing* implicados en el procesamiento de cada exón.

Sin embargo, los vectores para la construcción de minigenes son muy escasos. De hecho el más extendido es el plásmido pSPL3 (Invitrogen) que está descatalogado desde hace años. Este vector ha sido empleado en trabajos de investigación de los inventores de la presente invención (Acedo et al, 2012; Sanz et al, 2010) y presenta una serie de limitaciones. En primer lugar, su elevado tamaño (6,1 Kb) complica la clonación de insertos largos con varios exones consecutivos, necesarios para el mantenimiento del “contexto genómico” en las reacciones de *splicing*. En segundo lugar, la selección de las colonias recombinantes es ardua y laboriosa porque todas las colonias (con inserto o no) son resistentes a Ampicilina, pero no existe un segundo método de selección de los clones con inserto, por lo que forzosamente hay que rastrear todas las colonias obtenidas tras la transformación, y el rendimiento (proporción de colonias recombinantes) suele ser muy bajo. En tercer lugar, se han descrito la presencia de sitios crípticos de *splicing* y pseudoexones que pueden interferir en la reacción de *splicing* (Burn et al., 1995).

Otro vector comercial es el pExontrap (Mobitec), aunque ha sido poco utilizado en la bibliografía. Sin embargo, según evidencias experimentales obtenidas por los autores de la presente invención, las reacciones de RT-PCR producen productos de *splicing* inespecíficos comparados con los obtenidos con el uso del plásmido pSPL3, y por consiguiente su uso no resulta siempre conveniente. Otro vector es el pSpliceExpress (no comercial y de uso poco extendido) derivado del pExontrap cuya clonación está basado en la recombinación con la enzima Clonasa (Kishore et al, 2008) y, por tanto, no se emplean enzimas de restricción.

En consecuencia, existe la necesidad de disponer de nuevos vectores para la construcción de minigenes que permitan clonar fragmentos de DNA de mayor tamaño o con un mayor número de exones, y que a la vez minimicen los productos de *splicing* inespecíficos que pueden dar lugar a resultados erróneos. Además, sería conveniente que estos vectores dispusieran de un segundo sistema de selección que permitiera identificar fácilmente aquellos clones que contienen vectores con insertos de ADN en su secuencia.

Bibliografía

Acedo A, Sanz DJ, Durán M, Infante M, Pérez-Cabornero L, Miner C, Velasco EA (2012) Comprehensive splicing functional analysis of DNA variants of the BRCA2 gene by hybrid minigenes. Breast Cancer Res 14:R87.

Burn TC, Connors TD, Klinger KW, Landes GM (1995) Increased exon-trapping efficiency through modifications to the pSPL3 splicing vector. Gene 161:183-187.

Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. Nat Rev Genet 3:285-298.

Hertel KJ (2008) Combinatorial control of exon recognition. J Biol Chem 283:1211-1215.

Kalsotra A, Cooper TA (2011) Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. Nat Rev Genet 12:715-729.

Kishore S, Khanna A, Stamm S (2008) Rapid generation of splicing reporters with pSpliceExpress. Gene 427:104-110.

Lopez-Bigas N, Audit B, Ouzounis C, Parra G, Guigo R (2005) Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? FEBS Lett 579:1900-1903.

Sanz DJ, Acedo A, Infante M, Duran M, Perez-Cabornero L, Esteban-Cardenosa E, Lastra E, Pagani F, Miner C, Velasco EA (2010) A high proportion of DNA variants of *BRCA1* and *BRCA2* is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients. Clin Cancer Res 16:1957-1967.

Wang GS, Cooper TA (2007) Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. Nat Rev Genet 8:749-761.

Descripción de la invención

En base a lo anterior, la presente invención describe un vector génico útil para ensayos funcionales de *splicing*, denominado vector o plásmido pSAD (*Splicing And Disease*). El vector pSAD es un derivado del plásmido pSPL3b (SEQ ID No: 1) que tiene un tamaño menor (deleción de al menos 1,2 Kb) para facilitar su manipulación y el clonaje de grandes fragmentos con varios exones. En segundo lugar, se ha mejorado su capacidad de selección al introducir un casete *LacZ* (colonias azules/blancas). Además *LacZ* contiene un sitio de clonación múltiple (también referido en la presente descripción como MCS o polylinker) más completo que el del propio pSPL3b (27 vs. 10 dianas de restricción, respectivamente). Finalmente se ha realizado mutagénesis dirigida de dos dianas *HindIII*, una *XbaI* y una *Sall*, un sitio críptico aceptor, y también se ha potenciado el sitio aceptor del exón constitutivo nº 2 del vector mediante una triple mutagénesis para evitar reacciones cruzadas anómalas de

splicing. Su fácil manejo permite ensayar cualquier exón de cualquier gen humano y estudiar el efecto de las mutaciones sobre el splicing en cualquier enfermedad hereditaria, así como el estudio de los mecanismos básicos reguladores de este proceso en cada exón.

A lo largo de la presente descripción, el término “diana de restricción” puede encontrarse igualmente referido como “sitio de restricción” o simplemente como “diana”, y hace referencia a una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una determinada enzima de restricción, como por ejemplo son entre otras las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *XbaI* y *SaI*.

Un primer aspecto de la invención se refiere a un vector génico útil para ensayos funcionales de splicing obtenido a partir de una serie de modificaciones del plásmido pSPL3b de secuencia SEQ ID No: 1, que comprende:

- a. una delección de al menos 1,2 kilobases del intrón de SEQ ID No: 1, preferentemente donde dicha delección del intrón comprende la eliminación de los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1299 y 2498 de SEQ ID No: 1;
- b. una sustitución del sitio de clonación múltiple (MCS) de SEQ ID No: 1 por un casete *lacZ*, donde dicho casete *lacZ* comprende una primera mutación de eliminación de un primer sitio críptico aceptor de splicing;
- c. una segunda mutación de fortalecimiento de un segundo sitio aceptor de splicing, en al menos tres nucleótidos comprendidos entre las posiciones 2835 y 2875 (más preferentemente entre las posiciones 2841 y 2857) de SEQ ID No: 1;
- d. al menos una tercera mutación de inhabilitación de al menos una diana de restricción comprendida entre las posiciones 340 y 2623 de SEQ ID No: 1, y donde dicha mutación comprende al menos una modificación de un nucleótido de la secuencia de la diana.

El plásmido pSPL3b de partida, que consiste en SEQ ID No: 1, presenta las siguientes características:

- Exón constitutivo 1 del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 349 y 696 de SEQ ID No: 1;
- Exón constitutivo 2 del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2856 y 3121 de SEQ ID No: 1;
- Sitio donador de splicing del exón constitutivo 1 del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 690 y 704 de SEQ ID No: 1;
- Sitio aceptor de splicing del exón constitutivo 2 del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2835 y 2875 de SEQ ID No: 1;
- Intrón del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 697 y 2855 de SEQ ID No: 1;
- Sitio de clonación múltiple de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1010 y 1122 de SEQ ID No: 1;
- Primera diana *HindIII* de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 340 y 345 de SEQ ID No: 1, con corte en posición 341;
- Segunda diana *HindIII* de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2618 y 2623 de SEQ ID No: 1, con corte en posición 2619;
- Primera diana *XbaI* de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 679 y 684 de SEQ ID No: 1, con corte en posición 680;
- Primera diana *SaI* de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 685 y 690 de SEQ ID No: 1, con corte en posición 686;
- Primera diana *EcoRI* de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1010 y 1015 de SEQ ID No: 1, con corte en posición 1011;
- Primera diana *NdeI* de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1117 y 1122 de SEQ ID No: 1, con corte en posición 1119.

Según se entiende la invención, la delección del intrón de SEQ ID No: 1 definida en **a** reduce el tamaño del plásmido pSPL3b por eliminación de al menos 1,2 kilobases (1200 pares de bases) de una secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 797 y 2755 de SEQ ID No: 1, y hasta un máximo de 1846 nucleótidos para mantener la funcionalidad del intrón y el sitio de clonación múltiple de pSPL3b. Dicha delección comprende la eliminación de al menos 1,2 kilobases que se localizan entre las posiciones (797)..(1009) y (1123)..(2755) de SEQ ID No: 1, resultando preferida una delección de los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1299 y 2498 de SEQ ID No: 1. De este modo, la delección según la invención mantiene inalterados al menos los 113 nucleótidos correspondientes al sitio de clonación múltiple de pSPL3b (posiciones 1010 a 1122 de SEQ ID No: 1), 100 nucleótidos del intrón contiguos al exón constitutivo 1 del plásmido pSPL3b (posiciones 697 a 796 de SEQ ID No: 1) y 100 nucleótidos del intrón contiguos al exón constitutivo 2 del plásmido pSPL3b (posiciones 2756 a 2855 de SEQ ID No: 1). La delección del intrón máxima (1846 pb) daría lugar a un intrón final

de tan sólo 313 pb (incluyendo el MCS de pSPL3b) por delección de la secuencia de nucleótidos comprendidas entre las posiciones (797)..(1009) y (1123)..(2755) de SEQ ID No: 1.

En una realización preferida, la delección del intrón comprende la eliminación de los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1299 y 2498 de SEQ ID No: 1.

5 En la presente invención, el término casete *lacZ* se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia codificante del gen del péptido alfa de la β -galactosidasa (gen *lacZ*), incluyendo promotor y terminación de la transcripción y traducción, es decir, los elementos necesario para tener la funcionalidad de dicho gen *lacZ*. Aunque el uso de casetes *lacZ* está muy extendido, cualquier casete *lacZ* conocido por un especialista del campo es susceptible de ser empleado en la presente invención, como por ejemplo son los casetes *lacZ* que se encuentran en plásmidos ya descritos como pUC18, pGEM, etc. Sin embargo, son especialmente preferidos para la presente invención aquellos casetes *lacZ* que tienen un MCS más completo, como por ejemplo el casete *lacZ* comprendido en el plásmido pBluescript II KS (-) (Stratagene) SEQ ID No: 21 (preferentemente la secuencia comprendida entre las posiciones 445 y 949 de SEQ ID No: 21).

15 Según la invención, la secuencia del casete *lacZ* comprende además una mutación eliminadora de un sitio críptico aceptor de splicing, y se refiere a un cambio en al menos un nucleótido de la secuencia de *lacZ* que permite disminuir la fortaleza de dicho sitio críptico, manteniendo inalterada la secuencia de aminoácidos por la que codifica dicho gen *lacZ*. La fortaleza de sitios de splicing (aceptores o dadores), puede evaluarse mediante el uso de herramientas específicas para tal fin, como por ejemplo el software NNSPLICE (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) que evalúa los sitios de splicing de una secuencia mediante un valor numérico en una escala de entre 0 y 1, de tal manera que cuanto más próximo a 1 sea el valor mayor es la fortaleza del sitio de splicing. Mediante el uso de este tipo de software, se comprobó que para eliminar el sitio críptico aceptor de splicing del casete *lacZ*, el codón 13 de la secuencia codificante de *lacZ* (tomando como primer codón de dicha secuencia codificante el codón de iniciación Met) tiene que consistir en un triplete que codifica para treonina seleccionado del grupo compuesto por: ACC, ACG y ACA. En consecuencia, la secuencia del casete *lacZ* que comprende la mutación eliminadora de dicho sitio críptico aceptor se refiere a un casete *lacZ* donde el codón 13 de la secuencia codificante de *lacZ* es distinto de ACT, y consiste en un triplete nucleotídico que se selecciona entre ACC, ACG o ACA. No obstante, resulta más preferido el codón ACA, ya que debilita en mayor medida el sitio críptico aceptor de splicing. A modo de ejemplo, cuando el casete *lacZ* es la secuencia comprendida entre las posiciones 445 y 949 de SEQ ID No: 21 [plásmido pBluescript II KS (-)], la secuencia codificante de *LacZ* se refiere a la hebra complementaria entre las posiciones 816 y 454 de la SEQ ID No: 21. En concreto, el sitio críptico aceptor al que hace referencia esta invención comprende la secuencia complementaria en las posiciones 780 a 778 de SEQ ID No: 21 que corresponde al codón 13 (triplete de nucleótidos ACT que codifica para treonina) de la secuencia codificante de *lacZ*, tomando como primer codón de dicha secuencia codificante el codón de iniciación Met (ATG en secuencia complementaria, posiciones 816 a 814 de SEQ ID No: 21). En consecuencia, la mutación para eliminar o debilitar el sitio críptico aceptor consiste en cambiar el tercer nucleótido de dicho triplete (adenina, A) en posición 778 de la SEQ ID No: 21 en la secuencia de ADN codificante por un nucleótido seleccionado entre timina (T), citosina (C) o guanina (G), dando lugar a los codones codificantes en la secuencia complementaria para treonina ACA, ACG y ACC, respectivamente. No obstante, resulta más preferido el cambio por timina (codón ACA), ya que como se menciona anteriormente debilita en mayor medida el sitio críptico aceptor de splicing.

En una realización preferida, el casete *lacZ* de la sustitución definida en **b** es SEQ ID No: 2. Esto quiere decir que, la sustitución definida en **b** comprende sustituir la secuencia de nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1016 y 1116 de SEQ ID No: 1 por SEQ ID No: 2, de tal manera que en una realización preferida dicha sustitución comprende la eliminación de la secuencia comprendida entre las posiciones 1011 y 1118 de SEQ ID No: 1 con enzimas *EcoRI* y *NdeI*, y una inserción posterior del casete *lacZ* SEQ ID No: 2 con extremos *MunI* y *NdeI*. Un ejemplo preferido de casete *lacZ* con extremos *MunI* y *NdeI* consiste en la secuencia nucleotídica comprendida entre las posiciones 1010 y 1521 de SEQ ID No: 3. De este modo, la sustitución definida en **b** consiste en reemplazar con dicha secuencia nucleotídica los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1011 y 1118 de SEQ ID No: 1. Particularmente, SEQ ID No: 2 comprende entre las posiciones 370 y 372 la secuencia complementaria TAC del codón de iniciación Met (ATG) de *lacZ*, y entre los nucleótidos 334 y 336 de SEQ ID No: 2 se localiza la secuencia complementaria del codón 13 (TGT) que comprende la mutación para eliminar o debilitar el sitio críptico aceptor de splicing anteriormente mencionado.

El tamaño de un sitio aceptor de splicing varía entre los algoritmos usados para su búsqueda, pero se considera que 17 nucleótidos es un tamaño óptimo para definir la fortaleza de un sitio aceptor, donde los 15 primeros nucleótidos corresponden al extremo 3' del intrón y los dos nucleótidos siguientes pertenecen al extremo 5' del exón. Por tanto, la segunda mutación del sitio aceptor de splicing, como se define anteriormente en el apartado **c**, se dirige principalmente a los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 2841 y 2857 de SEQ ID No: 1, de tal manera que por medio de dicha segunda mutación la secuencia entre dichas posiciones responde a una secuencia consenso de sitio aceptor de splicing SEQ ID No: 34.

En realizaciones preferidas, para obtener un fortalecimiento del segundo sitio aceptor de splicing, el vector génico comprende una segunda mutación que consiste en al menos:

- c.1.** un primer cambio de Adenina por Timina en el nucleótido en posición 2846 de SEQ ID No: 1 (2846A>T),
- c.2.** un segundo cambio de Guanina por Timina en el nucleótido en posición 2849 de SEQ ID No: 1 (2849G>T),
- c.3.** un tercer cambio de Adenina por Guanina en el nucleótido en posición 2856 de SEQ ID No: 1 (2856A>G).

Con el cambio de los tres nucleótidos definidos en **c.1**, **c.2** y **c.3**, según el software NNSPLICE que evalúa los sitios de splicing (valor entre 0 y máximo 1), se pasa de un valor del sitio aceptor de 0,64 del pSPL3b a un valor de 0,99 con los tres cambios.

El plásmido pSPL3b SEQ ID No: 1 comprende entre las posiciones 340 y 2867 de su secuencia [preferentemente entre las posiciones (340)..(1009) y (1123)..(2623) de SEQ ID No: 1] distintas dianas de restricción que bien se pueden encontrar en el sitio del MCS del casete *lacZ* (p. e. las dianas *HindIII* comprendidas entre las posiciones 340 a 345 y 2618 a 2623 de SEQ ID No: 1, la diana *XbaI* comprendida entre las posiciones 679 y 684 de SEQ ID No: 1 o la diana *SaI* comprendida entre las posiciones 685 y 690 de SEQ ID No: 1), o bien pueden generar extremos compatibles con dianas del MCS del casete *lacZ* (como puede ser la diana *BglII* comprendida entre las posiciones 2862 y 2867 de SEQ ID No: 1 que genera extremos compatibles con la diana *BamHI* del MCS de *lacZ*), resultando conveniente su eliminación mediante mutaciones en la secuencia de dichas dianas. Por tanto, para aumentar la versatilidad del vector, ya que son enzimas de restricción muy comunes y que se usan habitualmente para clonar, el vector génico comprende una tercera mutación como se definió en **d** que se selecciona entre:

- d.1.** una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una primera diana *HindIII* comprendida entre las posiciones 340 y 345 de SEQ ID No: 1, siendo preferida la modificación que consiste en un cambio de Guanina por Adenina en el nucleótido en posición 342 de SEQ ID No: 1 (342G>A); y además una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una segunda diana *HindIII* comprendida entre las posiciones 2618 y 2623 de SEQ ID No: 1, siendo preferida la modificación que consiste en un cambio de Guanina por Adenina en el nucleótido en posición 2620 de SEQ ID No: 1 (2620G>A);
- d.2.** una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una tercera diana *XbaI* comprendida entre las posiciones 679 y 684 de SEQ ID No: 1, siendo preferida la modificación que consiste en un cambio de Timina por Citosina en el nucleótido en posición 679 de SEQ ID No: 1 (679T>C);
- d.3.** una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una cuarta diana *SaI* comprendida entre las posiciones 685 y 690 de SEQ ID No: 1, siendo preferida la modificación que consiste en un cambio de Guanina por Adenina en el nucleótido en posición 685 de SEQ ID No: 1 (685G>A);

y cualquier combinación de las mismas.

De este modo, para eliminar la diana *HindIII* heredada del plásmido SEQ ID No: 1, la tercera mutación del vector génico objeto de la presente invención tiene que comprender una de las modificaciones de la primera diana *HindIII* definidas en **d.1** y una de las modificaciones de la segunda diana *HindIII* definidas en **d.1**. Por tanto, en una realización preferida, el vector génico comprende las mutaciones de las dos dianas *HindIII* definidas en **d.1**, como por ejemplo el vector que consiste en la secuencia SEQ ID No: 3 (pSAD v5.0).

Sin embargo, para eliminar la diana *XbaI* heredada del plásmido SEQ ID No: 1 es suficiente con que el vector génico presente como tercera mutación una cualquiera de las modificaciones definidas en **d.2**, y para eliminar la diana *SaI* heredada del vector SEQ ID No: 1, dicho vector génico tiene que presentar una tercera mutación que consista en una de las modificaciones definidas anteriormente en **d.3**.

No obstante, la mayor versatilidad se obtiene cuando el vector génico comprende una de las mutaciones definidas en **d.1**, una de las mutaciones definidas en **d.2** y una de las mutaciones definidas en **d.3**. De hecho, en una realización preferida, el vector génico objeto de la presente invención comprende los tres tipos de mutaciones definidas en **d.1**, **d.2** y **d.3**, como el descrito más adelante en uno de los ejemplos, que consiste en SEQ ID No: 4 (pSAD v6.0).

En una realización preferida del vector génico definido en este aspecto de la invención, así como de cualquiera de sus realizaciones anteriores, dicho vector consiste en un plásmido de secuencia nucleotídica SEQ ID No: 79. En dicha secuencia, el nucleótido en posición 679 se selecciona independientemente entre timina (T) o citosina (C) y el nucleótido en posición 685 se selecciona independientemente entre guanina (G) o adenina (A). Cuando el nucleótido en posición 679 es timina y el nucleótido en posición 685 es guanina, dicho vector es el vector denominado pSAD v5.0 que consiste en SEQ ID No: 3. Cuando el nucleótido en posición 679 es citosina y el nucleótido en posición 685 es adenina, dicho vector es el vector denominado pSAD v6.0 que consiste en SEQ ID No: 4.

En otra realización preferida del vector génico de este aspecto de la invención, así como de cualquiera de sus realizaciones anteriores, dicho vector consiste en un plásmido de secuencia nucleotídica seleccionada entre SEQ ID No: 3 (pSAD v5.0) ó SEQ ID No: 4 (pSAD v6.0).

El vector pSAD v5.0 de secuencia SEQ ID No: 3 presenta las siguientes características:

- Exón constitutivo 1 heredado del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 349 y 696 de SEQ ID No: 3;
- Exón constitutivo 2 heredado del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2059 y 2323 de SEQ ID No: 3;
- Sitio donador de splicing del exón constitutivo 1, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 690 y 704 de SEQ ID No: 3;
- Sitio aceptor de splicing del exón constitutivo 2, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2038 y 2078 de SEQ ID No: 3;
- Gen de resistencia a ampicilina, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 3139 y 3999 de SEQ ID No: 3;
- Gen lacZ, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1015 y 1519 de SEQ ID No: 3;
- Sitio de clonación múltiple (del gen lacZ), que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1223 y 1330 de SEQ ID No: 3;
- Promotor SV40, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 23 y 345 de SEQ ID No: 3.

El vector pSAD v6.0 de secuencia SEQ ID No: 4 presenta las siguientes características:

- Exón constitutivo 1 heredado del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 349 y 696 de SEQ ID No: 4;
- Exón constitutivo 2 heredado del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2059 y 2323 de SEQ ID No: 4;
- Sitio donador de splicing del exón constitutivo 1, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 690 y 704 de SEQ ID No: 4;
- Sitio aceptor de splicing del exón constitutivo 2, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2038 y 2078 de SEQ ID No: 4;
- Gen de resistencia a ampicilina, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 3139 y 3999 de SEQ ID No: 4;
- Gen lacZ, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1015 y 1519 de SEQ ID No: 4;
- Sitio de clonación múltiple (del gen lacZ), que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1223 y 1330 de SEQ ID No: 4;
- Promotor SV40, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 23 y 345 de SEQ ID No: 4.

Los vectores génicos SEQ ID No: 3 (pSAD v5.0) y SEQ ID No: 4 (pSAD v6.0) han sido transformados independientemente en la cepa de *Escherichia coli* DH5α.

Cepa *Escherichia coli* DH5α transformada con el plásmido pSAD v5.0 SEQ ID No: 3 (CECT 8152)

La siguiente cepa transformada con dicho plásmido SEQ ID No: 3 (pSAD v5.0) ha sido depositada el 23 de MAYO de 2012 en la **Colección Española de Cultivos Tipo** (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, Paterna, 46980 Valencia (ESPAÑA), por Eladio A. Velasco Sampedro, INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR del CSIC, C/ Sanz y Forés 3, 47003 Valladolid (ESPAÑA).

El depósito de la cepa anterior (y que comprende el plásmido SEQ ID No: 3) cuya referencia es pSAD v5.0, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 8152** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

Cepa *Escherichia coli* DH5α transformada con el plásmido pSAD v6.0 SEQ ID No: 4 (CECT 8153)

5 La siguiente cepa transformada con dicho plásmido SEQ ID No: 4 (pSAD v6.0) ha sido depositada el 23 de MAYO de 2012 en la **Colección Española de Cultivos Tipo** (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, Paterna, 46980 Valencia (ESPAÑA), por Eladio A. Velasco Sampedro, INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR del CSIC, C/ Sanz y Forés 3, 47003 Valladolid (ESPAÑA).

10 El depósito de la cepa anterior (y que comprende el plásmido SEQ ID No: 4) cuya referencia es pSAD v6.0, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 8153** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

En la presente memoria, todos los vectores génicos útiles para ensayos de splicing definidos anteriormente pueden ser igualmente referidos como “*vectores de la invención*” o “*plásmidos de la invención*”.

15 Los vectores de la invención anteriormente definidos presentan las siguientes ventajas:

- Reducción de tamaño del plásmido (pSPL3: 6,031 Kb vs. 4,993 Kb de pSAD), lo cual permite la clonación de insertos de mayor tamaño con varios exones.
- Mejora de la capacidad de selección de colonias "recombinantes" (con inserto) mediante la introducción del gen *LacZ* (β -galactosidasa) procedente del pBluescript II KS(-) que permite una selección por color en presencia de X-Gal e IPTG (colonias azules-no recombinantes/colonias blancas – con inserto).
- Nuevo sitio de clonación múltiple (**MCS**) dentro de *LacZ* (27 sitios de restricción) superando el polylinker de pSPL3 (10 sitios), lo cual dota de mayor versatilidad para la selección de las enzimas de clonaje.
- Eliminación de dos de los tres sitios *HindIII* mediante mutagénesis dirigida, lo cual permite el uso de *HindIII* del MCS para clonaje.
- Eliminación de un sitio crítico aceptor de splicing presente en *LacZ* mediante mutagénesis dirigida para evitar posibles reacciones artefactuales de splicing.
- Fortalecimiento del sitio aceptor del exón constitutivo 2 del vector mediante triple mutagénesis dirigida. De acuerdo al software NNSPLICE, el sitio aceptor previo de pSPL3 era débil (score 0,64). De este modo se potencia hasta 0,99 (máximo 1,0), lo cual evita la selección errónea de sitios críticos en las reacciones de *splicing*.

Uno de los objetivos de la presente invención es la realización de ensayos funcionales de splicing mediante la construcción de “minigenes híbridos” en los vectores o plásmidos de la invención, dentro de lo cual se pueden distinguir 2 aplicaciones fundamentales:

- Conocimiento básico de los mecanismos reguladores del procesamiento del ARN mensajero (splicing). Cualquier exon puede ser clonado y estudiado con el vector pSAD.
- Biomedicina: estudio de enfermedades genéticas. Se trata de la principal aplicación:
 - Estudio de la correlación entre splicing aberrante de genes responsables de estas enfermedades y susceptibilidad genética a dichas enfermedades.
 - Estudio del efecto de variantes de ADN sobre el procesamiento del ARN mensajero.
 - Clasificación de variantes de ADN de significado clínico desconocido como inocuas o mutaciones causantes de enfermedad, de importancia esencial para el Consejo Genético en enfermedades hereditarias. De hecho, la mayoría de las variantes de ADN detectadas en pacientes no pueden ser clasificadas como polimorfismos o patogénicas. Cualquier exón de cualquier gen humano puede ser estudiado en el vector pSAD sin necesidad de ARN del paciente (principal hándicap en este tipo de estudios).

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un minigen útil para ensayos funcionales de splicing, que comprende un vector de la invención como cualquiera de los definidos anteriormente y además al menos una secuencia de nucleótidos clonada en el sitio de clonación múltiple del casete o gen *lacZ* de dicho vector. La inserción de tan solo un nucleótido en el sitio de clonación múltiple del vector de la invención es suficiente para interrumpir la pauta de lectura de la proteína *lacZ* y dar colonias blancas en vez de azules. Por tanto, teniendo en cuenta que mediante el empleo de plásmidos se ha conseguido clonar hasta 20 kilobases (20000 nucleótidos), el vector de la invención permite identificar una secuencia de nucleótidos clonada en el MCS de *lacZ* con un tamaño comprendido entre 1 y 20000 nucleótidos.

Según la invención, preferentemente la secuencia de nucleótidos insertada en el minigen comprende al menos la secuencia de un exón de un gen, siendo preferidos los exones de genes de predisposición a una enfermedad. Aunque existen exones cuyas secuencias contienen 1 ó 2 nucleótidos (Coyne et al. *Genome Biology* 2011, 12:R100), para el reconocimiento del exón durante la reacción de splicing es necesario que la secuencia de nucleótidos insertada comprenda, además de la secuencia del exón, las secuencias de nucleótidos de los intrones que flanquean a dicho exón en el gen, sugiriéndose un mínimo de 100 nucleótidos que incluyan los sitios naturales aceptor y donador y el punto de ramificación natural de cada exón para el correcto funcionamiento del minigen. Por tanto, en el ámbito de la presente invención, el término "minigen útil para ensayos funcionales de splicing" hace referencia preferentemente a cualquier construcción en el vector pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) o en el vector pSAD v6.0 (SEQ ID No: 4) que contenga al menos un exón y sus secuencias intrónicas flanqueantes completas o parciales, donde las secuencias intrónicas flanqueantes contienen el sitio aceptor, el punto de ramificación y el sitio donador. Por regla general se sugiere incluir un mínimo de 100 nucleótidos del intrón, aunque estas cifras pueden variar dependiendo del intrón ya que existen secuencias reguladoras, como por ejemplo el punto de ramificación, que no tienen una posición fija. No obstante, en el caso de intrones pequeños puede ser necesario mantener la totalidad del intrón.

Como se mencionó anteriormente, el tamaño mínimo de un intrón humano es de alrededor 80-100 nucleótidos (tamaño medio de los intrones humanos pequeños 92 pb), resultando conveniente mantener en el inserto al menos 100 nucleótidos de las secuencias intrónicas flanqueantes. Sin embargo, los intrones pueden tener decenas de kilobases, resultando poco práctico insertar el intrón completo debido al aumento excesivo del tamaño del minigen, y por ello se suelen insertar de 100 a 400 nucleótidos (incluidos ambos límites) dependiendo de la composición de las secuencias intrónicas flanqueantes, sobre todo en lo referente a la presencia de secuencias repetitivas, tales como SINES o LINES. Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos normalmente comprende, además de los nucleótidos del exón, entre 100 y 400 nucleótidos de cada una de las regiones intrónicas flanqueantes más próximas al exón. Esto quiere decir, que la secuencia de nucleótidos insertada en el minigen cuando comprende un exón preferentemente consistiría en al menos:

- entre los 100 y 400 últimos nucleótidos del extremo 3' del intrón precedente a dicho exón, y que corresponden con los nucleótidos más próximos a dicho exón;
- la secuencia de nucleótidos del exón;
- entre los 100 y 400 primeros nucleótidos del extremo 5' del intrón posterior a dicho exón, y que corresponden con los nucleótidos más próximos a dicho exón.

En la secuencia de nucleótidos insertada anterior, más preferentemente, los nucleótidos del intrón precedente están unidos al extremo 5' del exón, mientras que los nucleótidos del intrón posterior están unidos al extremo 3' de dicho exón, de tal manera que la secuencia insertada (o inserto) comprende la secuencia de nucleótidos en la orientación adecuada como aparece en el gen natural. En ejemplos de realización preferidos, se obtuvieron minigenes que comprenden una secuencia de nucleótidos insertada con un tamaño comprendido entre 1,5 y 6 kilobases.

Según la invención, genes adecuados para insertar en el minigen son genes que poseen exones e intrones en su secuencia de tal manera que para su expresión en un organismo requieren una etapa de procesamiento del pre-ARNm o "*splicing*", como por ejemplo son entre otros los genes de organismos eucariotas cuya secuencia está recogida en la base de datos ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/>), resultando preferidos aquellos genes de predisposición a una enfermedad.

En el ámbito de la invención, el término "genes de predisposición a una enfermedad" se refiere a aquellos genes que cuando presentan una mutación se incrementa el riesgo de padecer una enfermedad hereditaria. Así por ejemplo, mutaciones en los genes *BRCA* (*BRCA1* y/o *BRCA2*) incrementan significativamente el riesgo de padecer cáncer de mama y ovario, y el riesgo de otros tipos de tumores. Dentro de esta categoría, caben citar los genes *PALB2*, *Abraxas*, *XRCC2*, *BRIP1*, *ATM*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *CHEK2*, *NBS1*, *TP53* y *PTEN* (todos ellos implicados en cáncer de mama y/o ovario hereditario), así como otros genes responsables de enfermedades hereditarias como *CFTR* (Fibrosis Quística), *NF1* (Neurofibromatosis tipo I), *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*

(síndrome de Lynch), *PKD1* y *PKD2* (Poliquistosis renal del adulto), entre otros, así como los genes y enfermedades descritos en el catálogo OMIM ("Online Mendelian Inheritance in Man") de enfermedades hereditarias humanas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>), o los genes de organismos eucariotas cuya secuencia está recogida en la base de datos ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/>).

- 5 En realizaciones preferidas, el gen de predisposición a una enfermedad es un gen implicado en síndromes cancerosos hereditarios, como los genes *BRCA1* y/o *BRCA2* de predisposición a cáncer de mama y ovario, cuyas secuencias son ampliamente conocidas y pueden encontrarse en bases de datos como ENSEMBL (ver http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000012048;r=17:41196312-41277500;t=ENST00000357654 para la secuencia anotada del gen *BRCA1* y http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000139618;r=13:32889611-32973347;t=ENST00000380152 para la secuencia anotada del gen *BRCA2*). Más preferentemente, el gen de predisposición a una enfermedad es el gen *BRCA2*.

15 En una realización preferida, el minigen como se definió anteriormente y en cualquiera de sus realizaciones preferidas, consiste en uno que se selecciona del grupo compuesto por: SEQ ID No: 5 (MGBR2_EX19-24), SEQ ID No: 6 (MGBR2_EX19-25), SEQ ID No: 7 (MGBR2_EX19-26), SEQ ID No: 8 (MGBR2_EX19-27), SEQ ID No: 9 (MGBR2_EX25-26), SEQ ID No: 10 (MGBR2_EX10), SEQ ID No: 11 (MGBR2_EX4-7), SEQ ID No: 12 (MGBR2_EX3-7), SEQ ID No: 13 (MGBR2_EX3-8), SEQ ID No: 14 (MGBR2_EX3-9), SEQ ID No: 15 (MGBR2_EX2-9), SEQ ID No: 16 (MGBR2_EX17-18), SEQ ID No: 17 (MGBR2_EX16-18) y SEQ ID No: 18 (MGBR2_EX16-20).

20 El minigen MGBR2_EX19-24 con secuencia SEQ ID No: 5 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24, y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1316 y 4180 de SEQ ID No: 5 comprende a los exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24, y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1-1315 y 4181-7849 de SEQ ID No: 5 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2_EX19-25 con secuencia SEQ ID No: 6 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1316 y 5127 de SEQ ID No: 6 comprende a los exones 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1-1315 y 5128-8796 de SEQ ID No: 6 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

35 El minigen MGBR2_EX19-26 con secuencia SEQ ID No: 7 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1316 y 5959 de SEQ ID No: 7 comprende a los exones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1-1315 y 5960-9628 de SEQ ID No: 7 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2_EX19-27 con secuencia SEQ ID No: 8 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1316 y 6935 de SEQ ID No: 8 comprende a los exones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1-1315 y 6936-9820 de SEQ ID No: 8 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2_EX25-26 con secuencia SEQ ID No: 9 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 25 y 26 y secuencias flanqueantes de los intrones 24, 25 y 26 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- 5 - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1265 y 3991 de SEQ ID No: 9 comprende a los exones 25 y 26 y secuencias flanqueantes de los intrones 24, 25 y 26 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1264 y 3992–7675 de SEQ ID No: 9 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

10 El minigen MGBR2_EX10 con secuencia SEQ ID No: 10 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exon 10 y secuencias flanqueantes de los intrones 9 y 10 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1277 y 3236 de SEQ ID No: 10 comprende al exon 10 y secuencias flanqueantes de los intrones 9 y 10 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1276 y 3237–6920 de SEQ ID No: 10 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

15 El minigen MGBR2_EX4-7 con secuencia SEQ ID No: 11 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 4, 5, 6 y 7 y secuencias flanqueantes de los intrones 3, 4, 5, 6 y 7 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1283 y 3610 de SEQ ID No: 11 comprende a los exones 4, 5, 6 y 7 y secuencias flanqueantes de los intrones 3, 4, 5, 6 y 7 del gen *BRCA2*;
- 20 - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1282 y 3611–7294 de SEQ ID No: 11 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2_EX3-7 con secuencia SEQ ID No: 12 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 3, 4, 5, 6 y 7 y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- 25 - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1283 y 4377 de SEQ ID No: 12 comprende a los exones 3, 4, 5, 6 y 7 y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1282 y 4378–8061 de SEQ ID No: 12 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

30 El minigen MGBR2_EX3-8 con secuencia SEQ ID No: 13 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 3, 4, 5, 6, 7 y 8 y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1283 y 4931 de SEQ ID No: 13 comprende a los exones 3, 4, 5, 6, 7 y 8 y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 del gen *BRCA2*;
- 35 - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1282 y 4932–8600 de SEQ ID No: 13 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2_EX3-9 con secuencia SEQ ID No: 14 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- 40 - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1283 y 5550 de SEQ ID No: 14 comprende a los exones 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1282 y 5551–9219 de SEQ ID No: 14 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2_EX2-9 con secuencia SEQ ID No: 15 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y secuencias flanqueantes de los intrones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- 5 - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1246 y 6222 de SEQ ID No: 15 comprende a los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y secuencias flanqueantes de los intrones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1245 y 6223–9891 de SEQ ID No: 15 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

10 El minigen MGBR2_EX17-18 con secuencia SEQ ID No: 16 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 17 y 18 y secuencias flanqueantes de los intrones 16, 17 y 18 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1270 y 2775 de SEQ ID No: 16 comprende a los exones 17 y 18 y secuencias flanqueantes de los intrones 16, 17 y 18 del gen *BRCA2*;
- 15 - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1269 y 2776–6497 de SEQ ID No: 16 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2_EX16-18 con secuencia SEQ ID No: 17 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 16, 17 y 18 y secuencias flanqueantes de los intrones 15, 16, 17 y 18 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- 20 - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1270 y 3530 de SEQ ID No: 17 comprende a los exones 16, 17 y 18 y secuencias flanqueantes de los intrones 15, 16, 17 y 18 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1269 y 3531–7252 de SEQ ID No: 17 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

25 El minigen MGBR2_EX16-20 con secuencia SEQ ID No: 18 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 16, 17, 18, 19 y 20 y secuencias flanqueantes de los intrones 15, 16, 17, 18, 19 y 20 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1270 y 4671 de SEQ ID No: 18 comprende a los exones 16, 17, 18, 19 y 20 y secuencias flanqueantes de los intrones 15, 16, 17, 18, 19 y 20 del gen *BRCA2*;
- 30 - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1269 y 4672–8340 de SEQ ID No: 18 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

De los minigenes anteriores SEQ ID No: 5 a SEQ ID No: 18, el minigen SEQ ID No: 8 (denominado MGBR2_EX19-27) contiene un inserto de 5620 pb.

35 En la presente memoria, todos los minigenes útiles para ensayos de splicing definidos anteriormente en este aspecto de la invención, así como cualquiera de sus realizaciones preferidas, pueden ser igualmente referidos como “*minigenes de la invención*”.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una célula (eucariota o procariota) que comprende un vector génico de la invención o un minigen de la invención. Las células que comprenden este tipo de vectores o minigenes son de utilidad a la hora de realizar ensayos funcionales de splicing o para la clonación de distintos fragmentos con exones, o para la transformación, almacenamiento y replicación de los vectores y los diferentes minigenes. De hecho, para ensayos funcionales de splicing se transfectan a células eucariotas, como por ejemplo son entre otras las células de origen humano HeLa, las células derivadas de tumor de mama humano MCF-7, las células de carcinoma hepatocelular humano Hep3B, las células no tumorales de epitelio mamario humano MCF10A o las células COS de mono verde africano. Para los experimentos de clonaje de fragmentos de exones, mantenimiento y replicación de plásmidos y construcciones derivadas se emplean células procariotas, principalmente cepas de *Escherichia coli* capaces de hacer complementación en α de la β -galactosidasa (p. ej. la cepa de *E. coli* DH5 α ampliamente utilizada u otras cepas de *E. coli* como son entre otras XL1-Blue, XL10-Gold, JM83, JM101, JM103, JM105, JM107, JM109 y JM110). Las células que comprenden el vector o el minigen de la invención pueden obtenerse siguiendo los procedimientos habituales de transfección en células eucariotas o transformación en células procariotas, conocidos por cualquier especialista en el campo.

En una realización preferida, la célula anterior que comprende un vector génico de la invención, o un minigen de la invención, es una bacteria, y más preferentemente es la cepa de *E. coli* DH5α.

En otra realización preferida, cuando dicha célula es una bacteria, dicha bacteria se selecciona entre CECT 8152 o CECT 8153. Como se mencionó anteriormente, la cepa CECT 8152 es una cepa de *Escherichia coli* DH5α transformada con el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3). La cepa CECT 8153 es una cepa de *Escherichia coli* DH5α transformada con el plásmido pSAD v6.0 (SEQ ID No: 4).

En la presente memoria, cualquiera de las células definidas anteriormente en este aspecto de la invención que comprende un vector génico o un minigen de la invención con utilidad para ensayos de splicing, así como en cualquiera de sus realizaciones preferidas, puede ser igualmente referida como "célula de la invención".

Un cuarto aspecto de la invención hace referencia a un procedimiento de obtención de un vector génico de la invención que, a partir del plásmido pSPL3b de secuencia SEQ ID No: 1, comprende las siguientes etapas:

A.1. reducir el tamaño del plásmido SEQ ID No: 1 mediante delección de al menos 1,2 kilobases del intrón por una primera mutagénesis dirigida con un primer par de cebadores específicos para dicha delección, donde la secuencia de un cebador comprende una secuencia de al menos 25 nucleótidos consecutivos comprendidos entre las posiciones 1125 y 1394 de SEQ ID No: 1 (preferentemente los 25 nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1274 y 1298), donde dicha secuencia se encuentra unida por el extremo 3' a una secuencia de al menos 25 nucleótidos consecutivos comprendidos entre las posiciones 2349 y 2617 de SEQ ID No: 1 (preferentemente los 25 nucleótidos comprendidos entre las posiciones 2499 y 2523), y la secuencia del otro cebador es la complementaria;

A.2. amplificar un casete *lacZ* con extremos *MunI* y *NdeI* mediante PCR con una enzima de alta fidelidad (por ejemplo, Phusion de Finnzymes) y un segundo par de cebadores, donde uno de los cebadores comprende en su secuencia una diana *MunI* (y preferentemente dicha secuencia comprende SEQ ID No: 85), y otro cebador comprende en su secuencia una diana *NdeI* (y preferentemente la secuencia de dicho cebador comprende SEQ ID No: 86);

A.3. eliminar el sitio de clonación múltiple del plásmido SEQ ID No: 1 mediante enzimas de restricción *EcoRI* y *NdeI*, y clonar el casete *lacZ* amplificado en **A.2**;

A.4. eliminar un sitio críptico aceptor fuerte de splicing del casete *lacZ*, mediante una segunda mutagénesis dirigida con un tercer par de cebadores, donde uno de los cebadores comprende SEQ ID No: 87 (y preferentemente consiste en SEQ ID No: 24) y el otro cebador comprende SEQ ID No: 88 (y preferentemente consiste en SEQ ID No: 25);

A.5. fortalecer el sitio aceptor de splicing canónico del segundo exón constitutivo, comprendido entre las posiciones 2835 y 2875 de SEQ ID No: 1, mediante una tercera mutagénesis dirigida a las posiciones 2846, 2849 y 2856 con un cuarto par de cebadores, donde uno de los cebadores comprende SEQ ID No: 26, y el otro cebador comprende SEQ ID No: 27;

A.6. inhabilitar al menos una diana de restricción comprendida entre las posiciones 340 y 2623 de SEQ ID No: 1 [preferentemente entre las posiciones (340)..(345), (679)..(684), (685)..(690) y/o (2618)..(2623) de SEQ ID No: 1] mediante al menos una cuarta mutagénesis dirigida a modificar un nucleótido comprendido en la secuencia de dicha diana, con al menos un quinto par de cebadores específicos que comprendan en su secuencia la mutación o modificación de dicho nucleótido.

Según el procedimiento anterior, dicho quinto par de cebadores con la mutación deseada en su secuencia, comprende:

- un cebador que consiste en una secuencia de un fragmento de 20 a 50 nucleótidos de SEQ ID No: 1 (más preferentemente entre 35 y 42 nucleótidos), donde dicho fragmento comprende la secuencia nucleotídica entre las posiciones (340)..(345), (679)..(690) ó (2618)..(2623) de SEQ ID No: 1 y donde al menos un nucleótido entre dichas posiciones se encuentra modificado;
- y otro cebador que consiste en la secuencia complementaria del anterior.

Esto quiere decir que, para eliminar las dos dianas *HindIII* se requiere una doble mutagénesis dirigida, una de ellas con un par de cebadores con la mutación de la diana *HindIII* en posición (340)..(345) de SEQ ID No: 1, como pueden ser los cebadores SEQ ID No: 28 y SEQ ID No: 29, y otra con otro par de cebadores con la mutación de la diana *HindIII* en posición (2618)..(2623) de SEQ ID No: 1, como son por ejemplo los cebadores SEQ ID No: 30 y SEQ ID No: 31. Por otra parte, las dianas *XbaI* entre las posiciones (679)..(684) de SEQ ID No:

1 y *Sall* entre las posiciones (685)..(690) de SEQ ID No: 1, aunque se pueden inhabilitar una u otra de manera independiente, la utilización del par de cebadores SEQ ID No: 32 y SEQ ID No: 33 conduce a su eliminación simultánea, ya que en sus respectivas secuencias comprenden una mutación en un nucleótido de dicha diana *XbaI* y una mutación de dicha diana *Sall*.

- 5 En cuanto a los cebadores para amplificar el casete *lacZ*, además de incluir en su secuencia las dianas *MunI* o *NdeI*, se entiende que comprenden también al menos los primeros 20 nucleótidos de los extremos de la secuencia del casete *lacZ* que se amplifica. Es decir, uno de los cebadores contiene unido al extremo 3' de la secuencia de la diana *MunI* una secuencia de al menos 20 nucleótidos (preferentemente entre 21 y 23 nucleótidos) del extremo 5' de una de las hebras de ADN del casete *lacZ* que se desea amplificar. Así por ejemplo, el cebador SEQ ID No: 22 comprende los primeros 23 nucleótidos del casete *lacZ* de pBluescript II KS (-) de secuencia SEQ ID No: 2 unidos al extremo 5' de SEQ ID No: 85, donde esta última secuencia comprende el sitio de restricción *MunI* en su extremo 3'. Por otra parte, el otro cebador contiene unido al extremo 3' de la secuencia de la diana *NdeI* una secuencia de al menos 20 nucleótidos del extremo 5' (preferentemente entre 21 y 23 nucleótidos) de la hebra complementaria de dicho casete *lacZ*. En este caso, un ejemplo es el cebador SEQ ID No: 23, el cual comprende los primeros 21 nucleótidos del extremo 5' de la secuencia complementaria a SEQ ID No: 2 unidos al extremo 5' de SEQ ID No: 86, donde esta última secuencia comprende el sitio de restricción *NdeI* en su extremo 3'.

A lo largo de la presente descripción, el término "cebador" puede encontrarse igualmente referido como "primer" y hace referencia a la secuencia de nucleótidos habitualmente empleadas en el estado de la técnica y que sirven como punto de partida para la replicación del ADN.

En una realización preferida del procedimiento de obtención de un vector génico de la invención, la delección de al menos 1,2 kilobases del intrón comprende la eliminación de los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1299 y 2498 de SEQ ID No: 1 y se lleva a cabo mediante el primer par de cebadores que comprende un cebador que consiste en SEQ ID No: 19 y un cebador que consiste en SEQ ID No: 20.

- 25 En otra realización preferida de dicho procedimiento, o de la realización anterior, el casete *lacZ* amplificado en la etapa **A.2** se obtiene por amplificación del plásmido pBluescript II KS (-), de secuencia SEQ ID No: 21, con el cebador SEQ ID No: 22 que comprende en su secuencia una diana *MunI* y con el cebador SEQ ID No: 23 que comprende en su secuencia una diana *NdeI*.

30 En otra realización preferida de dicho procedimiento, o de cualquiera de sus realizaciones anteriores, el quinto par de cebadores para inhabilitar la diana de restricción se selecciona entre al menos uno de los siguientes:

- A.6.1.** un cebador que comprende SEQ ID No: 28 y un cebador que comprende SEQ ID No: 29, para eliminar mediante mutagénesis dirigida la diana *HindIII* comprendida entre las posiciones 340 y 345 de SEQ ID No 1, y además un cebador que comprende SEQ ID No: 30 y un cebador que comprende SEQ ID No: 31, para eliminar mediante otra mutagénesis dirigida la diana *HindIII* comprendida entre las posiciones 2618 y 2623 de SEQ ID No 1;

- A.6.2.** un cebador que comprende SEQ ID No: 32 y un cebador que comprende SEQ ID No: 33, para eliminar la diana *XbaI* comprendida entre las posiciones 679 y 684 de SEQ ID No: 1 y la diana *Sall* comprendida entre las posiciones 685 y 690 de SEQ ID No: 1.

40 Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso de un vector génico de la invención, o de un minigen de la invención o de una célula de la invención en ensayos funcionales de splicing.

Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de un vector génico de la invención, o de un minigen de la invención o de una célula de la invención, para detectar una mutación en al menos un exón y/o intrón de un gen que produce un splicing defectuoso.

45 Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un método para ensayo funcional de splicing caracterizado porque, a partir de un vector génico de la invención, comprende los siguientes pasos:

- B.1.** clonar al menos una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un exón de un gen y sus secuencias intrónicas flanqueantes, con la orientación adecuada del sitio aceptor y donador de splicing, en una o dos dianas de restricción del sitio de clonación múltiple de un vector de la invención, o bien mediante inserción dirigida de un megaprimero que contiene el exón en dicho MCS, para obtener un minigen wild-type;

- B.2.** transformar el minigen wild-type anterior en una cepa bacteriana;

B.3. cultivar la cepa bacteriana transformada en presencia de ampicilina, X-Gal e IPTG y seleccionar colonias blancas;

B.4. aislar el minigen wild-type de una colonia blanca seleccionada del cultivo anterior y generar un minigen mutante que comprenda una mutación en el exón o secuencias intrónicas del gen, donde dicho minigen mutante se obtiene mediante mutagénesis dirigida sobre el minigen wild-type aislado por PCR y polimerasa de alta fidelidad [p. ej. Pfu Turbo (Agilent) o Phusion entre otras] con cebadores específicos que comprendan en su secuencia dicha mutación de acuerdo al protocolo descrito en <http://www.methodbook.net/pcr/pcrmut.html>;

B.5. transfectar el minigen mutante a una célula eucariota (preferentemente una célula HeLa);

B.6. extraer el ARN producido en un cultivo de la célula eucariota transfectada,

B.7. sintetizar cDNA a partir del ARN extraído mediante RT-PCR con cebadores específicos de los exones constitutivos del vector;

B.8. secuenciar y analizar el cDNA sintetizado en el paso **B.7.**

Breve descripción del contenido de las figuras

Figura 1. Representación del vector pSAD y procedimiento de clonaje en este vector. El inserto con los exones se genera mediante PCR con una polimerasa de alta fidelidad y unos primers en cuyos extremos tienen dianas para enzimas de restricción seleccionadas para que los sitios aceptor y donador del exón en estudio estén en la orientación apropiada con los exones constitutivos del vector. Se transforman células DH5α de *E. coli* seleccionando con Ampicilina-X-Gal-IPTG las colonias de color blanco ya que se ha interrumpido el gen LacZ. En pSAD y en la construcción se señalan las posibles reacciones de splicing, que se producirán una vez hayan sido introducidos en células eucariotas.

Figura 2. Esquema básico de construcción de un minigen en el nuevo vector pSAD y ensayos funcionales de splicing. Aplicaciones en el Consejo Genético de enfermedades hereditarias.

Figura 3. Ensayos funcionales de splicing del vector pSAD v5.0. Se transfectaron células HeLa con los plásmidos pSAD sin inserto y los minigenes del gen *BRCA2* MGBR2_EX19-24 (exones 19 a 24), MGBR2_EX19-25 (exones 19 a 25), MGBR2_EX19-26 (exones 19 a 26), MGBR2_EX19-27 (exones 19 a 27), y MGBR2_EX17-18 (exones 17 y 18), MGBR2_EX16-18 (exones 16 a 18) y MGBR2_EX16-20 (exones 16 a 20). Tras RT-PCR con los primers específicos (SEQ ID No: 75 y SEQ ID No: 76) de los exones constitutivos del vector los productos fueron cargados en un gel de agarosa al 1,2%. Se puede observar que los vectores pSAD sin insertos generan un ARNm de 184 pb, mientras que los minigenes de *BRCA2* construidos en pSAD generan transcritos de los tamaños esperados (los tamaños están indicados en nucleótidos debajo de cada banda amplificada). Se puede observar una escalera creciente en tamaño del producto de la RT-PCR según se van incorporando nuevos exones a los transcritos de cada minigen (de MGBR2_EX19-24 a MGBR2_EX19-27 -1109 a 2174 nucleótidos-, y de MGBR2_EX17-18 a MGBR2_EX16-20 -710 a 1199 nucleótidos-).

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Construcción de los vectores génicos para ensayos funcionales de splicing pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) y pSAD v6.0 (SEQ ID No: 4).

El punto de partida para la construcción de los vectores SEQ ID No: 3 y SEQ ID No: 4 es el vector pSPL3b de secuencia SEQ ID No: 1 (Burn et al., 1995). Las modificaciones que se han realizado se pueden resumir en los siguientes puntos:

I.1) Reducción de tamaño del vector. El plásmido pSPL3b (SEQ ID No: 1) tiene un intrón de 2159 pares de bases (pb). Para reducir su tamaño se provocó una delección intrónica de 1,2 Kilobases (Kb) mediante mutagénesis dirigida (primers SEQ ID No: 19 y SEQ ID No: 20 cuyas secuencias son, respectivamente, 5' GGATCAAAGCCTAAAGCCATGTGTAGGAAAACCTTTGCACCACTGCTG 3' y 5' CAGCAGTGGTGCAAAGTAGTTTTCTACACATGGCTTTAGGCTTTGATCC 3'). El nuevo vector, pSPL3bdel1200, fue secuenciado para confirmar la delección y transfectado en células HeLa. Mediante RT-PCR con primers (cebadores) específicos de los exones del vector se comprobó que la reacción de *splicing* se producía un producto del tamaño esperado (184 nucleótidos), en el cual se eliminaba el intrón y se unían

secuencialmente los dos exones del vector. Al vector lo denominamos pSAD v1.0 (*Splicing And Disease*) y consiste en SEQ ID No: 35.

I.2) Introducción del gen *LacZ* (pSAD v2.0). A continuación se amplificó el gen *LacZ* con su sitio de clonación múltiple (MCS) con una polimerasa de alta fidelidad a partir del plásmido pBluescriptKS KS II (-) (Stratagene) SEQ ID No: 21. Se utilizaron un primer *forward* SEQ ID No: 22 con un sitio de restricción *MunI* (C^AAATTG, compatible con *EcoRI*: G^AAATTC) en su 5' y un primer *reverse* SEQ ID No: 23 con un sitio *NdeI* (Forward: 5' CACACACAATTGTAACGCTTACAATTTCCATTGCG 3'; Reverse: 5' CACACACATATGGCGGGCAGTGAGCG CAACGCA 3'. El MCS de pSPL3b del 1200 (pSAD 1.0 o SEQ ID No: 35) tiene unos extremos *EcoRI-NdeI*, de modo que se eliminó mediante corte con estas enzimas y se introdujo mediante ligación con el casete *LacZ* de extremos *MunI-NdeI* anteriormente amplificado. De este modo, la nueva construcción tiene una fusión *EcoRI-MunI* (G^AAATTG) que no regenera ninguna de las 2 enzimas de restricción, permitiendo el uso de la diana *EcoRI* del MCS de *LacZ* para clonaje. Las colonias transformantes se seleccionaron en Ampicilina, X-Gal e IPTG, y se seleccionaron las colonias azules. Se comprobó mediante secuenciación la fidelidad de la secuencia de *LacZ*. Con la introducción del casete *LacZ* se incrementa la capacidad selectiva del vector en el clonado de fragmentos, facilitando el rastreo de colonias, ya que aquéllas que sean de color azul nos indicarán que el vector no tiene ningún inserto mientras que las de color blanco indicarán que hay un inserto en el MCS de *LacZ* que interrumpe dicho gen. De este modo se evita un rastreo de colonias arduo y laborioso como ocurre con pSPL3 y otros vectores de *splicing*. Mediante la introducción del gen *LacZ* se obtuvo el plásmido SEQ ID No: 36, también referido en la presente memoria como pSAD v2.0.

I.3) Mutagénesis dirigida de un sitio críptico aceptor de *LacZ* (pSAD v3.0). Con el software NNSPLICE (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) se comprobó que el gen *LacZ* presentaba un sitio aceptor críptico fuerte (NNSPLICE= 0,98) que podía interferir en las reacciones de *splicing*. Afectaba al aminoácido en posición 13 de *LacZ* que codifica para Treonina (TTTGTCCCTTT AGT GAGGGTTAATT, subrayado el sitio críptico, y en el codón 13 en negrita –la hebra codificante de *LacZ* es la complementaria–), por lo que diseñamos 2 primers de mutagénesis, un primer *forward* SEQ ID No: 24 y un primer *reverse* SEQ ID No: 25, de modo que se mantuviera la Thr13 (Forward: 5' CAGCTTTTGTCCCTTTTGTGAGGGTTAATTGCGCGCT 3', Reverse: 5' AGCGCGCAATTAACCCTCACAAAAGGGAACAAAAGCTG 3', subrayado el nucleótido que muta), se pasa de un codón ACT a un codón ACA, ambos codificantes para Thr y así se elimina el sitio aceptor críptico. Se seleccionaron las colonias azules y se secuenciaron los plásmidos para comprobar que se había introducido la mutación. Asimismo, como en el punto I.1, comprobamos en ensayos funcionales de *splicing* en células HeLa que no existía ninguna anomalía en la reacción de *splicing*. De este modo se obtuvo el plásmido pSAD v3.0 (SEQ ID No: 37).

I.4) Mutagénesis dirigida de dos dianas *HindIII* (pSAD v4.0). El nuevo vector pSAD v3.0 presentaba un total de 3 dianas *HindIII*: 2 heredadas del pSPL3b (posiciones 341 y 2619 de la secuencia original SEQ ID No: 1 de pSPL3b), y una presente en el sitio de clonación múltiple. Las 2 *HindIII* de pSPL3b inhabilitaban para su uso la diana *HindIII* del MCS, por lo que se decidió eliminarlas mediante doble mutagénesis dirigida con los cebadores para la diana *HindIII* en posición 341, *forward* (SEQ ID No: 28, 5' CTAGGCTTTTGCAAAAACTGGACTGTGTTTACT 3') y *reverse* (SEQ ID No: 29, 5' AGTAAACACAGTCCAAGTTTTTTGCAAAAGCCTAG 3'), y para la diana *HindIII* en posición 2619, *forward* (SEQ ID No: 30, 5' GAAATTAACAATTACACAACTTAATACACTCCTTAATTGAA 3') y *reverse* (SEQ ID No: 31, 5' TTCAATTAAGGAGTGATTAAGTTTGTGTAATTGTTAATTTC 3'). Nuevamente se seleccionaron colonias azules resistentes a ampicilina y se comprobó la presencia de las mutaciones mediante secuenciación del nuevo plásmido pSAD v4.0 (SEQ ID No: 38). Asimismo se comprobó que la reacción de *splicing* se producía sin ningún tipo de anomalía en células eucariotas.

I.5) Fortalecimiento del sitio aceptor del exón constitutivo nº 2 de pSAD (pSAD v5.0). Mediante análisis con NNSPLICE se comprobó que el sitio aceptor del exón 2 del vector pSAD v4.0 (heredado de pSPL3b) era débil (0,64, TATTCACCATTATCGTTTCAGACCTGGAGATCTCCCGAG). Se realizó mutagénesis dirigida, introduciendo 3 mutaciones en 3 posiciones críticas (+1A>G del exón, y -7G>T y -10A>T del intrón) en una sola pareja de primers de mutagénesis: SEQ ID No: 26 (5' GGGATATTCACCATTTCCTTTTCAGGCTGGAGATCTCCCGA 3') y SEQ ID No: 27 (5' TCGGGAGATCTCCAGGCTGAAAAGAAATGGTGAATATCCC 3'), donde se han subrayado las posiciones mutadas. De este modo el nuevo sitio de *splicing* pasaba a tener un valor de 0,99 según NNSPLICE (máximo 1,0). También comprobamos su eficiencia en reacciones de *splicing* mediante transfección en células HeLa. La estructura final, el esquema de clonado y la secuencia completa del plásmido pSAD se puede observar en las Figuras 1 y 2. Se comprobó el funcionamiento de esta versión del vector mediante ensayos funcionales de *splicing*.

I.6) Eliminación de las dianas *XbaI* y *SaI* en posición heredadas de pSPL3b (pSAD v6.0). El vector pSAD 5.0 presentaba una diana *XbaI* y *SaI* en las posiciones 680 y 686 de la SEQ ID No: 3 heredadas de pSPL3b que inhabilitaban las dianas *XbaI* en la posición 1248 y *SaI* en la posición 1305 del MCS. Se eliminaron ambas dianas de pSPL3b mediante doble mutagénesis dirigida con una única pareja de cebadores, *forward*, SEQ ID No: 32 (5' TGACAAGCTGCACGCCCTAGAATCGACCCAGCAGTAA 3'), y *reverse*, SEQ ID No: 33 (5'

TTACTGCTGGGTCGATTCTAGGGCGTGCAGCTTGTC 3'). Se seleccionaron las colonias azules, y se verificó en células HeLa que la reacción de splicing tenía lugar sin ningún tipo de anomalía.

I.7) Comprobación de su funcionamiento con un inserto de varios exones (ver siguientes ejemplos – Ejemplos 2 a 7–).

5 En conclusión, se puede decir que los nuevos plásmidos pSAD SEQ ID No: 3 y SEQ ID No. 4 aportan las siguientes ventajas:

- Facilidad de manipulación al tratarse de un vector de menor tamaño.
- Mayor capacidad de selección de colonias recombinantes, ya que aparte de la resistencia a Ampicilina, común a todos estos vectores, aporta la selección con β -Galactosidasa (LacZ), que en presencia de X-Gal e IPTG, permite distinguir colonias azules (con el vector íntegro) y blancas (posibles colonias con inserto).
- Mayor versatilidad, ya que *LacZ* aporta su MCS con hasta 27 sitios de restricción diferentes, lo cual permite elegir la enzima de restricción apropiada para cada experimento de clonado. Además se han eliminado 2 dianas *HindIII*, una *XbaI* y otra *Sall* de pSPL3b (SEQ ID No: 1), lo cual habilita las dianas correspondientes del MCS de *LacZ* SEQ ID No: 2.
- Eliminación de un sitio crítico de *splicing* que podría interferir en la reacción de *splicing*.
- Potenciación del sitio aceptor del exón constitutivo 2 de los vectores SEQ ID No: 3 y SEQ ID No: 4 (común a pSPL3b) para facilitar su reconocimiento por la maquinaria de *splicing*. De este modo se asegura la presencia del exón 2 de pSAD en los ensayos funcionales de *splicing*.

20 EJEMPLO 2. Construcción de los minigenes SEQ ID No: 5 (MGBR2_EX19-24), SEQ ID No: 6 (MGBR2_EX19-25), SEQ ID No: 7 (MGBR2_EX19-26) y SEQ ID No: 8 (MGBR2_EX19-27).

La construcción del minigen SEQ ID No: 8 es compleja y muy laboriosa. Para la construcción de este minigen se partió de otro que previamente se había clonado en el vector se pSPL3b SEQ ID No: 1 y de éste se generó un inserto completo para clonar en el vector pSAD. Además, se utilizaron dos métodos de clonaje: el clásico con enzimas de restricción y otro que hemos denominado en la presente memoria como "cloning por mutagénesis de inserción", mediante la síntesis de un "megaprimer" (inserto) por PCR con cebadores forward y reverse con zonas de hibridación en las secuencias flanqueantes a la zona de inserción, que funciona eficazmente para clonar fragmentos de en torno a 1 kb. A continuación se describe el esquema de construcción del minigen SEQ ID No: 8, mediante un procedimiento por el que se obtuvieron sucesivamente los minigenes SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6 y SEQ ID No: 7.

2.1. Clonaje de los exones 19 a 24 del gen *BRCA2* en el vector pSPL3b (SEQ ID No: 1).

Para el clonaje de los exones 19-24 en pSPL3b (SEQ ID No: 1) se empleó un procedimiento que comprendió las siguientes etapas:

35 **II.1)** Amplificación del inserto de los exones 21-22-23-24 y secuencias intrónicas del gen *BRCA2* mediante una polimerasa de alta fidelidad y los cebadores Forward: SEQ ID No: 39 (5' CACACACTCGAGCCTTCTTTGGGTGTTTTATGCT 3'); y Reverse: SEQ ID No: 40 (5' CACACAGGATCCAAATCAGAGGTTCAAAGAGGCT 3'). Tamaño del fragmento: 3.736 pb.

II.2) Digestión del plásmido pSPL3b y el inserto con los exones 21 a 24 con las enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.

40 **II.3)** Ligación de plásmido e inserto de los exones 4 a 7 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1, transformación de la cepa DH5 α y selección en presencia de Ampicilina.

II.4) Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de primer específico de pSPL3b y primer específico del inserto). Selección de colonias que amplifican el fragmento del tamaño esperado.

45 **II.5)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen pSPL3b-MGBR2_EX21-24, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 82.

II.6) Generación de una delección de 2000 pb del intrón 21 de *BRCA2* sobre la construcción pSPL3b_EX21-24 con los cebadores SEQ ID No: 41 (5' TTAAATGCAGGCAAACTTGTTTTAGCCATCTGTAATGTAGTTGGTGA 3') y SEQ ID No: 42 (5'

TCACCAACTACATTACAGATGGCTAAAAACAAGTTTTGCCTGCATTTTAA 3'). Esta delección del intrón para mejorar la manipulación del minigen reduciendo su tamaño. La delección se genera mediante una PCR de mutagénesis dirigida con Pfu Turbo polimerasa, tratamiento con 10 unidades de *DpnI* (específica de secuencias metiladas) durante una hora para eliminar el minigen original con el intrón 21 completo, transformación de células DH5 α y selección en presencia de Ampicilina. Se comprueba la delección mediante PCR de colonias y secuenciación del plásmido obtenido, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 83 y se denomina pSPL3b-MGBR2_EX21-24del2000.

II.7) Amplificación del inserto de los exones 19-20 de *BRCA2* y secuencias intrónicas del gen *BRCA2* mediante una polimerasa de alta fidelidad y los cebadores Forward: SEQ ID No: 43 (5' TCTGGAGCTCGAGCACACATCCGGAATAGCATTAAGAACTTGTAGCA 3'); y Reverse: SEQ ID No: 44 (5' CCAAGCATAAACACCCAAAGAAGGATTACAAATGGCTTAGACCTGA 3'). Tamaño del fragmento: 1214 pb.

II.8) El producto PCR de la etapa anterior se purifica mediante extracción de geles de agarosa de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

II.9) El producto purificado se utiliza como "megaprimer" con una polimerasa de alta fidelidad y se clona por un método que hemos denominado "Inserción por mutagénesis dirigida" (protocolo adaptado de GeneMorph II EZClone Domain Mutagenesis Kit de Agilent: www.genomics.agilent.com/files/Manual/200552_C01.pdf), el cual se puede usar de forma alternativa a las enzimas de restricción en fragmentos de aproximadamente 1 Kb.

II.10) Se digiere la reacción con 10 unidades de *DpnI* (específica de secuencias metiladas) durante una hora para eliminar el minigen original con los exones 21-24, y se mantiene intacta la molécula recién sintetizada con los exones 19 al 24. Se transforman células DH5 α y se lleva a cabo su selección en presencia de Ampicilina. Se comprueba la presencia de los exones 19-20 mediante PCR de colonias y secuenciación. El minigen final 19-24 contiene un inserto de 2865 pb con los exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24, y se denomina pSPL3b-MGBR2_EX19-24 cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 84.

2.2. Clonaje de los exones 19 a 24 del gen *BRCA2* en el vector pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) y posterior inserción de los exones 25, 26 y 27 del gen *BRCA2*.

Una vez descrito como se hizo el clonaje de los exones 19 a 24 del gen *BRCA2* en pSPL3b, se pasó a clonar dichos exones a pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3), siguiendo el siguiente procedimiento:

II.11) Se amplifica el inserto de pSPL3b-MGBR2_EX19-24 (SEQ ID No: 84) con polimerasa de alta fidelidad y los primers SEQ ID No: 45 (5' CACACACTCGAGCACACATCCGGAATAGCATTAAGAACTTGTAGCA 3') y SEQ ID No: 46 (5' CACACAGGATCCCACACAGGTACCAAATCAGAGGTTCAAAGAGGCT 3'). Tamaño del producto PCR: 2901 pb.

II.12) Digestión del plásmido pSAD 5.0 y el inserto de los exones 19 a 24 amplificado en II.11 con las enzimas de restricción *XhoI* y *KpnI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.

II.13) Ligación de plásmido e inserto de los exones 19-24 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1, transformación de la cepa DH5 α y selección en presencia de Ampicilina y X-Gal. Selección de colonias blancas.

II.14) Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que amplifican el fragmento del tamaño esperado.

II.15) Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2_EX19-24 cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 5.

II.16) Se amplifica el inserto correspondiente al exón 25 del gen *BRCA2* a partir de ADN genómico humano con polimerasa de alta fidelidad y los primers SEQ ID No: 47 (5' GTAAGCCTCTTTGAACCTCTGATTTAATCTGTACTCCTGTTAGCAAT 3') y SEQ ID No: 48 (5' CAAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCTCAGTGTCTTATCTGGGATT 3'). Tamaño del fragmento: 997 pb.

II.17) El producto PCR se purifica mediante extracción de geles de agarosa de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

II.18) El fragmento purificado anterior se utiliza como "megaprimer" con una polimerasa de alta fidelidad y se clona por el método de "Inserción por mutagénesis dirigida" en MGBR2_EX19-24 (SEQ ID No: 5).

II.19) Se digiere la reacción PCR con 10 unidades de *DpnI* durante una hora para eliminar el minigen original con los exones 19-24, y se mantiene intacta la molécula recién sintetizada con los exones 19 al 25. Se transforman

células DH5α y selección en presencia de Ampicilina. Se comprueba la presencia del exón 25 mediante PCR de colonias y secuenciación. El minigen final 19-25 contiene un inserto de 3812 pb con los exones 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25, y se denomina MGBR2_EX19-25 cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 6.

II.20) Se amplifica el inserto correspondiente al exón 26 del gen *BRCA2* con polimerasa de alta fidelidad y los primers SEQ ID No: 49 (5' CACACAGGTACCAGTAAATAGAGCTAGGACTTGA 3') y SEQ ID No: 50 (5' CACACAGGTACCTTGATTGTCATCTACTGTGATT 3'). Tamaño del producto PCR: 850 pb.

II.21) Digestión de la construcción MGBR2_EX19-25 y el inserto del exón 26 con las enzimas de restricción *KpnI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión y columnas Wizard de Promega.

II.22) Ligación de MGBR2_EX19-25 y exón 26 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1. Transformación de la cepa DH5α y selección en presencia de Ampicilina.

II.23) Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -por ejemplo T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado y en la orientación apropiada.

II.24) Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2_EX19-26 cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 7.

II.25) Amplificación del inserto del exón 27 del gen *BRCA2* con polimerasa de alta fidelidad y los primers SEQ ID No: 51 (5' CCAGCTTTTGTTCCTTTTGTGAGGGTCTTCCTTCCTTTTCATGTCATTT 3') y SEQ ID No: 52 (5' ATCTGTCTCTGTCTCTCTCTCCACCTTAATTTCTTTTCTCATTGTGCAAC 3'). Tamaño del fragmento: 994 pb. Mediante este procedimiento con estos cebadores se causaría la sustitución del exón constitutivo número 2 y parte del intrón del vector (752 pb) por el exón 27 (último exón) y parte del intrón 26 de *BRCA2* (944 pb).

II.26) El producto PCR se purifica mediante extracción de geles de agarosa de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

II.27) El fragmento purificado se utiliza como "megaprimer" con una polimerasa de alta fidelidad y se clona por el método de "Inserción por mutagénesis dirigida" en MGBR2_EX19-26 (SEQ ID No: 7).

II.28) Se digiere la reacción PCR con 10 unidades de *DpnI* durante una hora para eliminar el minigen original con los exones 19-26, y se mantiene intacta la molécula recién sintetizada con los exones 19 al 27. Se transforman células DH5α y selección en presencia de Ampicilina. Se comprueba la presencia del exón 27 mediante PCR de colonias y secuenciación. El minigen final 19-27 contiene un inserto de 5.620 pb con los exones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 y se denomina MGBR2_EX19-27 cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 8.

EJEMPLO 3. Construcción del minigen SEQ ID No: 9 (MGBR2_EX25-26).

A continuación se describe el esquema de construcción del minigen SEQ ID No: 9, mediante un procedimiento que comprendió las siguientes etapas:

III.1) Amplificación del inserto de los exones 25 y 26 del gen *BRCA2* con la polimerasa Phusion (Finnzymes) de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 53 (5' CACACAGGATCCTATACCTGCTTCCACATGACCT 3'); y Reverse: SEQ ID No: 54 (5' CACACACTCGAGGCCACATAACAACCACATTTTC 3'). Tamaño del fragmento: 2751 pb.

III.2) Digestión del plásmido pSAD 5.0 (SEQ ID No: 3) y el inserto de los exones 25 y 26 con las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

III.3) Ligación de plásmido e inserto de los exones 25-26 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1 y transformación de la cepa DH5α y selección en presencia de Ampicilina y X-Gal. Selección de colonias blancas.

III.4) Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.

III.5) Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2_EX25-26, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 9.

EJEMPLO 4. Construcción del minigen SEQ ID No: 10 (MGBR2_EX10).

A continuación se describe el esquema de construcción del minigen SEQ ID No: 10, mediante un procedimiento que comprendió las siguientes etapas:

- 5 **IV.1)** Amplificación del inserto del exón 10 del gen *BRCA2* con polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 55 (5' CACACACTGCAGACACAAAAACAAAGCCTATTGA 3'); y Reverse: SEQ ID No: 56 (5' CACACACTCGAGAAGAGTGATGGATATACACAAA 3'). Tamaño del fragmento: 1984 pb.
- IV.2)** Digestión del plásmido pSAD 5.0 (SEQ ID No: 3) y el inserto del exón 10 con las enzimas de restricción *Pst*I y *Xho*I. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).
- 10 **IV.3)** Ligación de plásmido e inserto del exón 10 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1 y transformación de la cepa DH5α y selección en presencia de Ampicilina y X-Gal. Selección de colonias blancas.
- IV.4)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.
- 15 **IV.5)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2_EX10, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 10.

EJEMPLO 5. Construcción de los minigenes SEQ ID No: 11 (MGBR2_EX4-7), SEQ ID No: 12 (MGBR2_EX3-7), SEQ ID No: 13 (MGBR2_EX3-8), SEQ ID No: 14 (MGBR2_EX3-9) y SEQ ID No: 15 (MGBR2_EX2-9).

- 20 A continuación se describe el esquema de construcción del minigen SEQ ID No: 14, mediante un procedimiento por el que se obtuvieron sucesivamente los minigenes SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 12 y SEQ ID No: 13, y que comprendió las siguientes etapas:
- V.1)** Amplificación del inserto de los exones 4, 5, 6 y 7 del gen *BRCA2* mediante Polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 57 (5' CACACAGAATTCTCTGGTACATTGGTAGGTTTTCA 3'); y Reverse: SEQ ID No: 58 (5' CACACACTCGAGCCAAATACTGCCTCTTAAACGC 3'). Tamaño del fragmento: 2352 pb.
- 25 **V.2)** Digestión del plásmido pSAD 5.0 (SEQ ID No: 3) y el inserto de los exones 4 a 7 con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xho*I. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.
- V.3)** Ligación de plásmido e inserto de los exones 4 a 7 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1 y transformación de la cepa DH5α y selección en presencia de Ampicilina y X-Gal.
- 30 **V.4)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que amplifican el fragmento del tamaño esperado.
- V.5)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2_EX4-7, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 11.
- 35 **V.6)** Amplificación del inserto del exón 3 del gen *BRCA2* mediante Polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 59 (5' CACACAGAATTCCACACATCCGGACACACATTCTGAAGCCATCTTGTAACCTTTT GTGAA 3'); y Reverse: SEQ ID No: 60 (5' CACACAGAATTCTTGGCATAAGAAAGACGTAATT 3'). Tamaño del fragmento: 808 pb.
- V.7)** Digestión de la construcción MGBR2_EX4-7 (SEQ ID No: 11) y el inserto del exón 3 con la enzima de restricción *Eco*RI. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.
- 40 **V.8)** Ligación de MGBR2_EX4-7 (SEQ ID No: 11) y el exón 3 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1. Transformación de la cepa DH5α y selección en presencia de Ampicilina.
- V.9)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -por ejemplo T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado y en la orientación apropiada.
- 45

V.10) Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2_EX3-7, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 12.

V.11) Amplificación del inserto del exón 8 del gen *BRCA2* mediante Polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 61 (5' CACACACTCGAGGTCATAACCTCACAGCATCATCT 3'); y Reverse: SEQ ID No: 62 (5' CACACAGGTACCCACACAAAGCTTCAACTTTAACAGAGAGACAGCA 3'). Tamaño del amplificado: 572 pb.

V.12) Digestión de la construcción MGBR2_EX3-7 (SEQ ID No: 12) y el inserto del exón 8 con las enzimas de restricción *XhoI* y *KpnI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.

V.13) Ligación de MGBR2_EX3-7 y exón 8 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1. Transformación de la cepa DH5α y selección en presencia de Ampicilina.

V.14) Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -por ejemplo T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que amplifican el fragmento del tamaño esperado.

V.15) Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2_EX3-8, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 13.

V.16) Amplificación del inserto del exón 9 del gen *BRCA2* mediante Polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 63 (5' CACACAAAGCTTTCCTAGTGGTGCAAGATTCAT 3'); y Reverse: SEQ ID No: 64 (5' CACACAGGTACCTGGTGCCAATTAAGAGTAG 3'). Tamaño del amplificado: 649 pb.

V.17) Digestión de la construcción MGBR2_EX3-8 (SEQ ID No: 13) y el inserto del exón 8 con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.

V.18) Ligación de MGBR2_EX3-8 (SEQ ID No: 13) y el exón 9 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1. Transformación de la cepa DH5α y selección en presencia de Ampicilina.

V.19) Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -por ejemplo T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.

V.20) Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2_EX3-9, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 14.

V.21) Amplificación del inserto del exón 2 del gen *BRCA2* con la polimerasa Phusion de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 65 (5' CACACACGGCCGGAATAATCGTATGAAAATCCT 3'); y Reverse: SEQ ID No: 66 (5' CACACATCCGGATAAGCTACATAAACAAGCAC 3'). Tamaño del amplificado: 739 pb.

V.22) Digestión de la construcción MGBR2_EX3-9 y el inserto del exón 2 con la enzima de restricción *EagI* y *BspEI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.

V.23) Ligación de MGBR2_EX3-9 y exón 2 con la ligasa FastLink (Epicentre). Transformación de la cepa DH5α y selección en presencia de Ampicilina.

V.24) Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -por ejemplo T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.

V.25) Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2_EX2-9, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 15.

EJEMPLO 6. Construcción de los minigenes SEQ ID No: 16 (MGBR2_EX17-18), SEQ ID No: 17 (MGBR2_EX16-18), y SEQ ID No: 18 (MGBR2_EX16-20).

A continuación se describe el esquema de construcción del minigen SEQ ID No: 18 con los exones 16 al 20 del gen *BRCA2*, mediante un procedimiento por el que se obtuvieron sucesivamente los minigenes SEQ ID No: 16, y SEQ ID No: 17, y que comprendió las siguientes etapas:

VI.1) Amplificación del inserto de los exones 17 y 18 del gen *BRCA2* mediante Polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 67 (5' GCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGTCAGTATGATACTTTGATACATGT

3'); y Reverse: SEQ ID No: 68 (5' ATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGTGGGAATAGGGATCTGATCAA 3'). Tamaño del fragmento: 1556 pb.

VI.2) El producto PCR anteriormente amplificado se purifica mediante extracción de geles de agarosa de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

5 **VI.3)** El fragmento purificado se utiliza como “megaprimer” con una polimerasa de alta fidelidad y se clona por el método de “Inserción por mutagénesis dirigida” en pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3).

VI.4) Se digiere la reacción PCR de la etapa VI.3 con 10 unidades de *DpnI* durante una hora para eliminar el plásmido pSAD utilizado como ADN molde de la reacción de inserción, y se mantiene intacta la molécula recién sintetizada con los exones 17 y 18.

10 **VI.5)** Transformación de la cepa DH5α y selección en presencia de Ampicilina y X-Gal. Selección de colonias blancas.

VI.6) Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.

15 **VI.7)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2_EX17-18, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 16.

VI.8) Amplificación del inserto del exón 16 del gen *BRCA2* mediante Polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 69 (5' GCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGCCCTTTTGTTCCTCATCTAAGT 3'); y Reverse: SEQ ID No: 70 (5' GACATGTATCAAAGTATCATACTGAATAAATGCCTAAGAAAAATGT 3'). Tamaño del producto PCR: 805 pb.

20 **VI.9)** El producto PCR se purifica mediante extracción de geles de agarosa de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

VI.10) El fragmento purificado se utiliza como “megaprimer” con una polimerasa de alta fidelidad y se clona por el método de “Inserción por mutagénesis dirigida” en MGBR2_EX17-18 (SEQ ID No: 16).

25 **VI.11)** Se digiere la reacción PCR con 10 unidades de *DpnI* durante una hora para eliminar el plásmido MGBR2_EX17-18 molde original, y se mantiene intacta la molécula recién sintetizada con los exones 16, 17 y 18.

VI.12) Transformación de la cepa DH5α con 5 µl de la reacción anterior y selección en presencia de Ampicilina.

VI.13) Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.

30 **VI.14)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2_EX16-18, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 17.

VI.15) Amplificación del inserto de los exones 19 y 20 del gen *BRCA2* mediante PCR con polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 71 (5' CACACACTCGAGATAGCATTAAAGAACTTGTAGCA 3'); y Reverse: SEQ ID No: 72 (5' CACACAGGTACCATTACAAATGGCTTAGACCTGA 3'). Tamaño del fragmento: 1165 pb.

35 **VI.16)** Digestión de la construcción MGBR2_EX16-18 (SEQ ID No: 18) y el inserto 19-20 con las enzimas de restricción *XhoI* y *KpnI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.

VI.17) Ligación de MGBR2_EX16-18 (SEQ ID No: 18) y los exones 19-20 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1. Transformación de la cepa DH5α y selección en presencia de Ampicilina.

40 **VI.18)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -por ejemplo T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.

VI.19) Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas.

45 **VI.20)** Eliminación de los restos del MCS de pSAD v5.0 entre los exones 18 y 19 mediante una delección generada con los primers Forward: SEQ ID No: 73 (5' TGCTTTGATCAGATCCCTATTCCACATAGCATTAAGAACTTGTAGCAGTA 3') y Reverse: SEQ ID No: 74 (5' TACTGCTACAAGTTCTTAATGCTATGTGGAATAGGGAT

CTGATCAAAGCA 3') mediante mutagénesis dirigida. Se digiere la reacción PCR con 10 unidades de *DpnI*. Estos dos últimos cebadores fueron diseñados para producir una delección de la secuencia del MCS de pSAD v5.0 existente entre los insertos de los exones 18 y 19 del gen *BRCA2*.

VI.21) Transformación de la cepa DH5 α y selección en presencia de Ampicilina.

- 5 **VI.22)** Secuenciación de varios clones para comprobar que se ha generado correctamente la delección. Esta construcción constituye el minigen MGBR2_EX16-20, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 18. Este minigen contiene un inserto final de 3402 pb con los exones 16-17-18-19-20 y las secuencias intrónicas flanqueantes correspondientes.

EJEMPLO 7. Comprobación del funcionamiento de los diferentes minigenes.

- 10 A continuación se describe el procedimiento común para la comprobación del correcto funcionamiento de los distintos minigenes obtenidos a partir de uno de los vectores pSAD objeto de la presente invención.

VII.1) Transfección de células HeLa con 1 μ g de cada minigen y 2 μ l de Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

VII.2) A las 24-48 horas, purificación de ARN con el kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante y cuantificación de la concentración de ARN en un espectrofotómetro.

- 15 **VII.3)** Retrotranscripción de 200 ng de ARN con el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

- 20 **VII.4)** Amplificación de 3 μ l de cDNA con la polimerasa GoTaq HotStart (Promega) y los primers específicos de los exones constitutivos del vector pSAD, Forward del exón constitutivo 1 del vector: SEQ ID No: 75 (5' TCACCTGGACAACCTCAAAG 3') o SEQ ID No: 80 (5' TGCTAAGCTGAGTGAAGT 3'), y Reverse del exón constitutivo 2 del vector: SEQ ID No: 76 (5' TGAGGAGTGAATTGGTCGAA 3') o SEQ ID No: 81 (5' GGAGTGAATTGGTCGAATG 3'), en las siguientes condiciones en el termociclador: (95°C, 2 min) + (35 ciclos x [95°C, 30 s / 63°C, 30 s / 72°C, 30 s-2 min]) + (72°C, 5 min). En los 35 ciclos, el intervalo de tiempo de la tercera etapa del ciclo a 72°C, el intervalo de tiempo varía entre 30 segundos y 2 minutos, dependiendo de la longitud del fragmento a amplificar, y es menor cuanto menor es dicha longitud.

- 25 **VII.5)** Comprobación en gel de agarosa y secuenciación del producto de la RT-PCR.

En la tabla 1 se presentan los tamaños de los productos RT-PCR de los minigenes SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 12, SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17 y SEQ ID No: 18, junto con el tamaño de los productos RT-PCR de los vectores génicos pSAD v5.0 (SEQ ID No:3) y pSAD v6.0 (SEQ ID No: 4).

30 Tabla 1

	Minigen	Tamaño total de la construcción (pb)	Tamaño del inserto clonado (pb)	Tamaño del ARN sintetizado (nucleótidos)
SEQ ID No: 3	pSAD v5.0		-	184
SEQ ID No: 4	pSAD v 6.0		-	184
SEQ ID No: 11	MGBR2_EX4-7	7294	2328	499
SEQ ID No: 12	MGBR2_EX3-7	8061	3095	748
SEQ ID No: 13	MGBR2_EX3-8	8600	3649	798
SEQ ID No: 14	MGBR2_EX3-9	9219	4268	910
SEQ ID No: 15	MGBR2_EX2-9	9891	4977	1016
SEQ ID No: 10	MGBR2_EX10	6920	1960	1300
SEQ ID No: 16	MGBR2_EX17-18	6497	1506	710
SEQ ID No: 17	MGBR2_EX16-18	7252	2261	898
SEQ ID No: 18	MGBR2_EX16-20	8340	3402	1199
SEQ ID No: 5	MGBR2_EX19-24	7849	2865	1109
SEQ ID No: 6	MGBR2_EX19-25	8796	3812	1354
SEQ ID No: 7	MGBR2_EX19-26	9628	4644	1501
SEQ ID No: 8	MGBR2_EX19-27	9820	5620	2174
SEQ ID No: 9	MGBR2_EX25-26	7675	2727	576

EJEMPLO 8. Ensayo funcional de *splicing* con los vectores pSAD SEQ ID No: 3 (pSAD v5.0) y SEQ ID No: 4 (pSAD v6.0).

El esquema básico de trabajo de un ensayo funcional de *splicing* en pSAD es el siguiente (Figura 2):

VIII.1) Cloning del exon(es) junto con las secuencias intrónicas flanqueantes en las dianas de restricción del MCS de *LacZ* con la orientación apropiada de los sitios aceptores y donadores para que se pueda llevar a cabo la reacción de *splicing*.

VIII.2) Transformación en la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. Selección de colonias blancas (con inserto) en Ampicilina, X-Gal e IPTG. Rastreo de colonias por PCR. Obtención de ADN plasmídico de alta pureza. Comprobación de la integridad del inserto mediante secuenciación.

VIII.3) Generación de mutaciones sobre el minigen *wild type* (<http://www.methodbook.net/PCR/PCRmut.html>) con primers específicos de cada mutación.

VIII.4) Transfección transitoria de células eucariotas en cultivo (por ejemplo HeLa) con 1 μ g de plásmido y Lipofectamina 2000 (Invitrogen).

VIII.5) Extracción de ARN a las 24-48 horas.

VIII.6) RT-PCR: Síntesis de cDNA a partir de 200 ng de ARN con Transcriptasa reversa (kit Transcriptor de Roche) y PCR con los primers específicos de los exones del vector que consisten en SEQ ID No: 77 (RT_SD6-FW 5' TCTGAGTCACCTGGACAACC 3') y en SEQ ID No: 78 (RT_SA2-RV 5' ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC 3'), donde el primer RT_SD6-FW (SEQ ID No: 77) está marcado con FAM (6-carboxyfluorescein).

VIII.7) Electroforesis en gel de agarosa y/o electroforesis capilar en secuenciador automático ABI3130. Este método ha sido puesto a punto recientemente por nuestro laboratorio (Acedo et al 2012, Breast Cancer Research 14: R87) y permite una resolución precisa (diferencias de 1 solo nucleótido) de todas las isoformas de *splicing* presentes. Análisis informático con el software Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems).

VIII.8) Secuenciación de todas los productos de la RT-PCR con el kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y electroforesis en secuenciador ABI3130. Análisis con el software Sequencing Analysis (Applied Biosystems) y alineamiento de secuencias obtenidas con la secuencia patrón mediante CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

En condiciones normales el experimento completo puede estar finalizado en unas tres semanas. Sin embargo, la generación de mutaciones y ensayo funcional de *splicing* en células HeLa puede realizarse en tan sólo 10 días.

Se realizó una construcción en pSAD que contenía los exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24 del gen *BRCA2* (tamaño total del inserto: 2865 pb; SEQ ID No: 5), uno de los principales genes de predisposición a cáncer de mama/ovario hereditario. El fragmento está orientado de modo que se produzcan correctamente las reacciones de *splicing* con los exones constitutivos de pSAD (V1-19-20-21-22-23-24-V2). Como en ocasiones anteriores, se comprobó que la construcción producía un ARNm del tamaño esperado (1109 nucleótidos) mediante RT-PCR con primers específicos (SEQ ID No: 77 y SEQ ID No: 78) de los exones del vector (Figura 3). Del mismo modo se comprobó que funcionaban correctamente las construcciones MGBR2_EX19-25 (exones 19 a 25), MGBR2_EX19-26 (exones 19 a 26), MGBR2_EX19-27 (exones 19 a 27), MGBR2_EX17-18 (exones 17 y 18), MGBR2_EX16-18 (exones 16 a 18), MGBR2_EX16-20 (exones 16 a 20), MGBR2_EX25-26 (exones 25 y 26), MGBR2_EX10 (exón 10), MGBR2_EX4-7 (exones 4 a 7), MGBR2_EX3-7 (exones 3 a 7), MGBR2_EX3-8 (exones 3 a 8), MGBR2_EX3-9 (exones 3 a 9) y MGBR2_EX2-9 (exones 2 a 9), que produjeron el ARNm del tamaño esperado mediante RT-PCR con primers específicos (SEQ ID No: 77 y SEQ ID No: 78) de los exones del vector (Tabla 1 y Figura 3).

En conclusión, la construcción de minigenes híbridos en pSAD, como las presentadas aquí con hasta 9 exones de *BRCA2*, es una herramienta muy útil para clasificar desde el punto de vista del *splicing* las variantes de ADN de significado clínico desconocido (hasta el 15% de las pacientes con cáncer de mama/ovario hereditario presentan una de estas variantes). Basta disponer de la construcción del minigen *wild type* y para generar sobre él la mutación detectada en un paciente mediante mutagénesis dirigida para realizar el ensayo funcional de *splicing*, todo ello sin necesidad de provocar molestias al paciente para la obtención de una nueva muestra.

REIVINDICACIONES

1. Vector génico útil para ensayos funcionales de splicing obtenido a partir del plásmido pSPL3b SEQ ID No:1, caracterizado porque comprende:

- a. una delección de al menos 1,2 kilobases del intrón de SEQ ID No: 1;
- b. una sustitución del sitio de clonación múltiple de SEQ ID No: 1 por un casete *lacZ*, donde dicho casete *lacZ* comprende una primera mutación de eliminación de un primer sitio críptico aceptor de splicing;
- c. una segunda mutación de fortalecimiento de un segundo sitio aceptor de splicing, en al menos tres nucleótidos comprendidos entre las posiciones 2835 y 2875 de SEQ ID No: 1;
- d. al menos una tercera mutación de inhabilitación de al menos una diana de restricción comprendida entre las posiciones 340 y 2623 de SEQ ID No: 1, y donde dicha mutación comprende al menos una modificación de un nucleótido de la secuencia de la diana.

2. Vector génico según la reivindicación 1, donde la delección del intrón comprende la eliminación de los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1299 y 2498 de SEQ ID No: 1.

3. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde el casete *lacZ* es SEQ ID No: 2.

4. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la sustitución definida en **b** comprende una eliminación de la secuencia comprendida entre las posiciones 1011 y 1118 de SEQ ID No: 1 con enzimas *EcoRI* y *NdeI*, y una inserción posterior del casete *lacZ* con extremos *MunI* y *NdeI*.

5. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la segunda mutación comprende:

- c.1. un primer cambio de Adenina por Timina en el nucleótido en posición 2846 de SEQ ID No: 1 (2846A>T),
- c.2. un segundo cambio de Guanina por Timina en el nucleótido en posición 2849 de SEQ ID No: 1 (2849G>T),
- c.3. un tercer cambio de Adenina por Guanina en el nucleótido en posición 2856 de SEQ ID No: 1 (2856A>G).

6. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la tercera mutación se selecciona entre:

- d.1. una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una primera diana *HindIII* comprendida entre las posiciones 340 y 345 de SEQ ID No: 1 y una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una segunda diana *HindIII* comprendida entre las posiciones 2618 y 2623 de SEQ ID No: 1,
- d.2. una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una diana *XbaI* comprendida entre las posiciones 679 y 684 de SEQ ID No: 1,
- d.3. una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una diana *Sall* comprendida entre las posiciones 685 y 690 de SEQ ID No: 1,

y cualquier combinación de las mismas.

7. Vector génico según la reivindicación 6, donde la modificación de la primera diana *HindIII* definida en **d.1** consiste en un cambio de Guanina por Adenina en el nucleótido en posición 342 de SEQ ID No: 1 (342G>A).

8. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, donde la modificación de la segunda diana *HindIII* definida en **d.1** consiste en un cambio de Guanina por Adenina en el nucleótido en posición 2620 de SEQ ID No: 1 (2620G>A).

9. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde la modificación definida en **d.2** consiste en un cambio de Timina por Citosina en el nucleótido en posición 679 de SEQ ID No: 1 (679T>C).

10. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde la modificación definida en **d.3** consiste en un cambio de Guanina por Adenina en el nucleótido en posición 685 de SEQ ID No: 1 (685G>A).
11. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde la tercera mutación comprende las modificaciones definidas en **d.1**.
- 5 12. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde la tercera mutación comprende las modificaciones definidas en **d.1**, **d.2** y **d.3**.
13. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que consiste en SEQ ID No: 79.
14. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que se selecciona entre SEQ ID No: 3 ó SEQ ID No: 4.
- 10 15. Minigen útil para ensayos funcionales de splicing, caracterizado porque comprende un vector definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y al menos una secuencia de nucleótidos clonada en el sitio de clonación múltiple del casete *lacZ* de dicho vector.
16. Minigen según la reivindicación 15, donde la secuencia de nucleótidos clonada, comprende al menos un exón de un gen y las secuencias parciales o totales de nucleótidos de los intrones que flanquean a dicho exón en el gen.
- 15 17. Minigen según la reivindicación 16, donde el gen es un gen de predisposición a una enfermedad.
18. Minigen según la reivindicación 17, donde el gen de predisposición a una enfermedad es un gen BRCA.
19. Minigen según la reivindicación 18 que se selecciona entre SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 12, SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17 y SEQ ID No: 18.
- 20 20. Célula que comprende un vector génico definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o un minigen definido en una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19.
21. Célula según la reivindicación 20, donde la célula es una bacteria.
22. Célula según la reivindicación 21, donde la bacteria es una cepa de *E. coli* DH5α.
- 25 23. Célula según una cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22, que es una seleccionada entre CECT 8152 ó CECT 8153.
24. Procedimiento de obtención de un vector génico definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque, a partir del plásmido pSPL3b de secuencia SEQ ID No: 1, comprende las siguientes etapas:
- 30 **A.1.** reducir el tamaño del plásmido SEQ ID No: 1 mediante delección de al menos 1,2 kilobases del intrón por una primera mutagénesis dirigida con un primer par de cebadores específicos para dicha delección, donde la secuencia de un cebador comprende una secuencia de al menos 25 nucleótidos consecutivos comprendidos entre las posiciones 1125 y 1394 de SEQ ID No: 1, unida por su extremo 3' a una secuencia de al menos 25 nucleótidos consecutivos comprendidos entre las posiciones 2349 y 2617 de SEQ ID No: 1, y la secuencia del otro cebador es la complementaria;
- 35 **A.2.** amplificar un casete *lacZ* con extremos *MunI* y *NdeI* mediante PCR con un segundo par de cebadores, donde uno de los cebadores comprende en su secuencia un sitio de restricción *MunI*, y otro cebador comprende en su secuencia un sitio de restricción *NdeI*;
- 40 **A.3.** eliminar el sitio de clonación múltiple del plásmido SEQ ID No:1 mediante enzimas de restricción *EcoRI* y *NdeI*, y clonar el casete *lacZ* amplificado en **A.2**;
- A.4.** eliminar un sitio críptico aceptor fuerte de splicing del casete *lacZ*, mediante una segunda mutagénesis dirigida con un tercer par de cebadores, donde uno de los cebadores comprende SEQ ID No: 87 y el otro cebador comprende SEQ ID No: 88;

- A.5.** fortalecer el sitio aceptor de splicing comprendido entre las posiciones 2835 y 2875 de SEQ ID No: 1 mediante una tercera mutagénesis dirigida a las posiciones 2846, 2849 y 2856 con un cuarto par de cebadores, donde uno de los cebadores comprende SEQ ID No: 26, y el otro cebador comprende SEQ ID No: 27;
- 5 **A.6.** inhabilitar al menos una diana de restricción comprendida entre las posiciones 340 y 2623 de SEQ ID No: 1 mediante al menos una cuarta mutagénesis dirigida a modificar un nucleótido comprendido en la secuencia de dicha diana, con un quinto par de cebadores específicos que comprendan en su secuencia la modificación de dicho nucleótido.
- 10 **25.** Procedimiento según la reivindicación 24, donde se delecionan 1,2 kilobases del intrón mediante un cebador que comprende SEQ ID No: 19 y un cebador que comprende SEQ ID No: 20.
- 26.** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 24 ó 25, donde el quinto par de cebadores para inhabilitar la diana de restricción se selecciona entre al menos uno de los siguientes:
- 15 **A.6.1.** un cebador que comprende SEQ ID No: 28 y un cebador que comprende SEQ ID No: 29, y además un cebador que comprende SEQ ID No: 30 y un cebador que comprende SEQ ID No: 31,
- A.6.2.** un cebador que comprende SEQ ID No: 32 y un cebador que comprende SEQ ID No: 33.
- 27.** Uso de un vector génico definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o de un minigen definido en una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, o de una célula definida en una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23 en ensayos funcionales de splicing.
- 20 **28.** Uso de un vector génico definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o de un minigen definido en una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, o de una célula definida en una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, para detectar una mutación en al menos un exón y/o intrón de un gen que produce un splicing defectuoso.
- 29.** Método para ensayo funcional de splicing caracterizado porque, a partir de un vector génico definido en una de las reivindicaciones 1 a 14, comprende los siguientes pasos:
- 25 **B.1.** clonar al menos una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un exón de un gen y sus secuencias intrónicas flanqueantes, con la orientación adecuada del sitio donador y aceptor de splicing, en el sitio de clonación múltiple de un vector definido en una de las reivindicaciones 1 a 14, para obtener un minigen wild-type;
- B.2.** transformar el minigen wild-type anterior en una cepa bacteriana;
- 30 **B.3.** cultivar la cepa bacteriana transformada en presencia de ampicilina, X-Gal e IPTG y seleccionar colonias blancas;
- B.4.** aislar el minigen wild-type de una colonia blanca seleccionada y generar un minigen mutante que comprenda una mutación en el exón o secuencias intrónicas del gen, donde dicho minigen mutante se obtiene mediante mutagénesis dirigida sobre el minigen wild-type aislado por PCR y polimerasa de alta fidelidad con cebadores específicos que comprendan en su secuencia dicha mutación;
- 35 **B.5.** transfectar el minigen mutante a una célula eucariota;
- B.6.** extraer el ARN producido en un cultivo de la célula eucariota transfectada,
- B.7.** sintetizar cDNA a partir del ARN extraído y realizar RT-PCR con cebadores específicos de los exones constitutivos del vector;
- 40 **B.8.** secuenciar y analizar el cDNA sintetizado en el paso **B.7.**

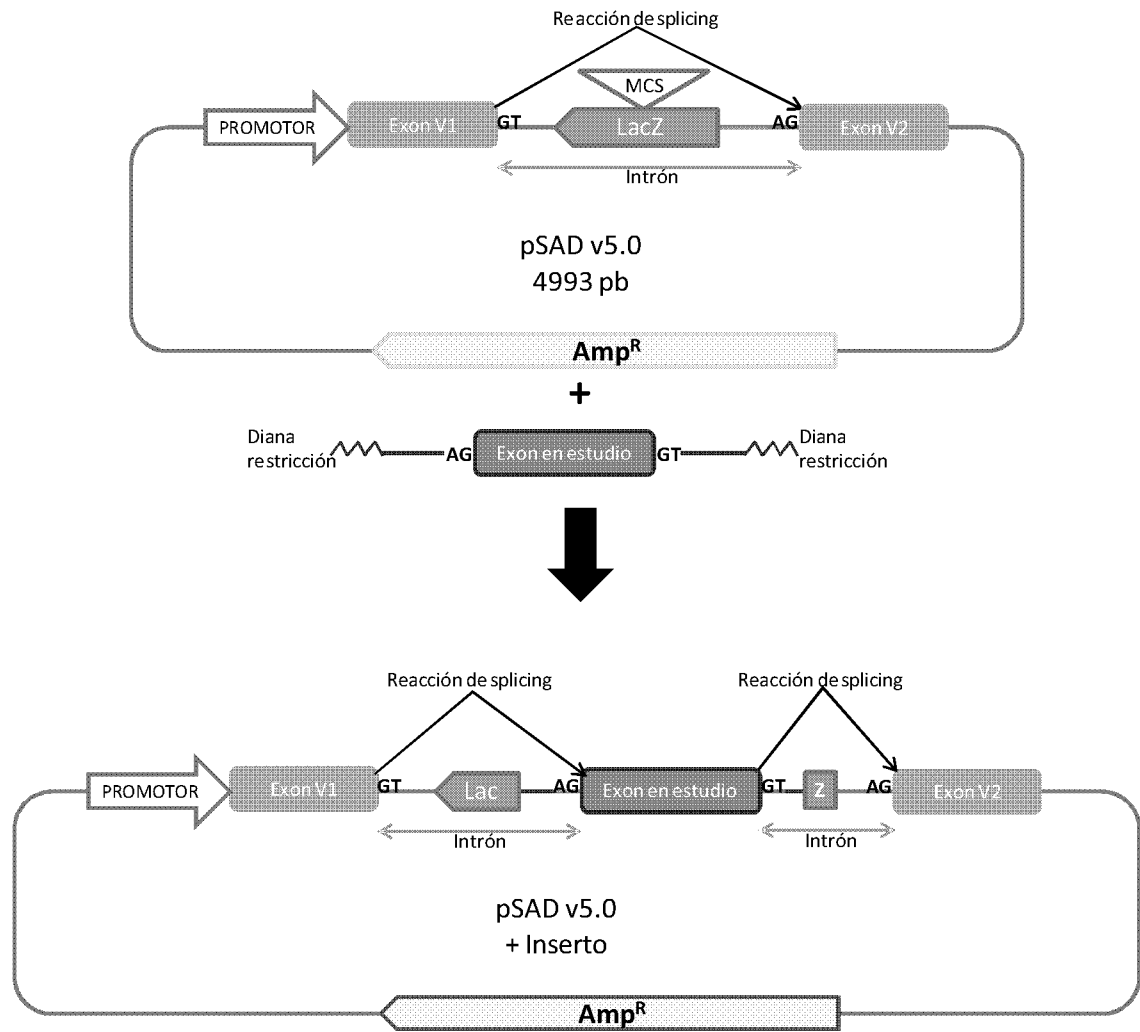


Figura 1

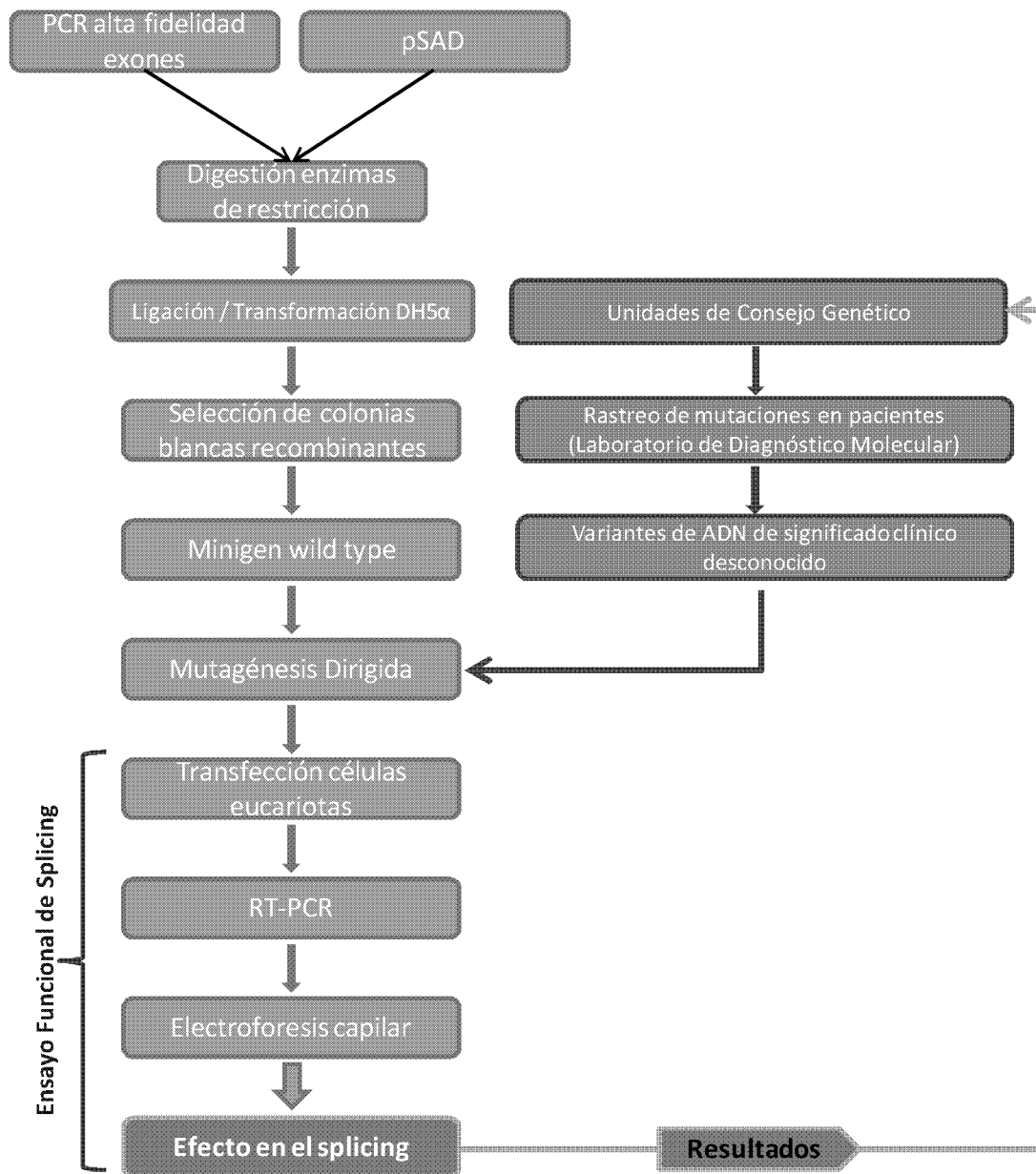


Figura 2

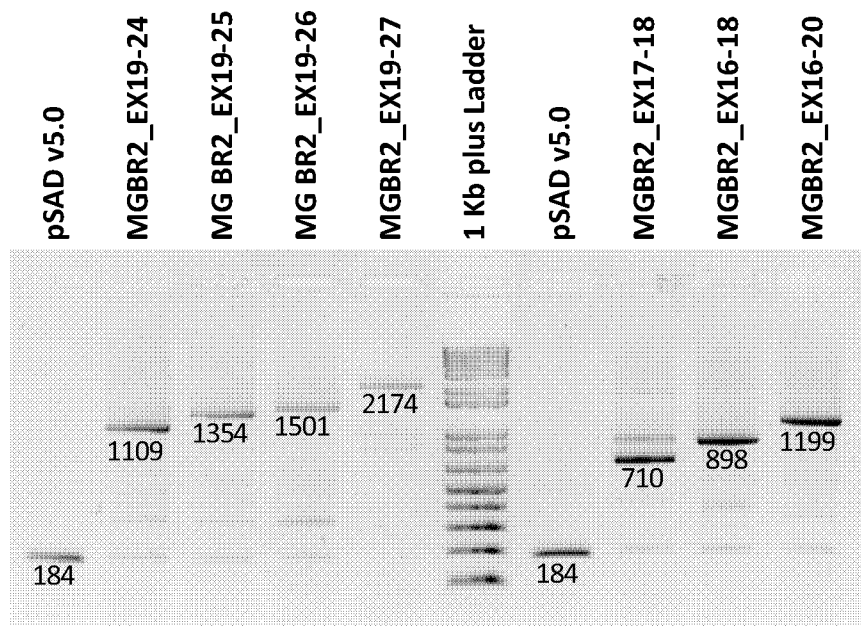


Figura 3

ES 2 470 440 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

<120> Plásmido pSAD para ensayos funcionales de splicing

<160> 88

<170> BISSAP 1.0

<210> 1
<211> 5792
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..5792
<223> /mol_type="DNA"
/note="Plásmido pSPL3b"
/organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1299..2498
<223> /note="Secuencia de la delección de 1,2 kilopares del plásmido
pSPL3b"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1010..1122
<223> /note="Sitio de clonación múltiple de pSPL3b"

<220>
<221> misc_feature
<222> 340..345
<223> /note="Primera diana HindIII de pSPL3b. Corte en posición 341"

<220>
<221> misc_feature
<222> 2618..2623
<223> /note="Segunda diana HindIII de pSPL3b. Corte en posición 2619"

<220>
<221> misc_feature
<222> 679..684
<223> /note="Diana XbaI de pSPL3b. Corte en posición 680"

<220>
<221> misc_feature
<222> 685..690
<223> /note="Diana SalI de pSPL3b. Corte en posición 686"

<220>
<221> misc_feature
<222> 2835..2875
<223> /note="Sitio aceptor de splicing del exón constitutivo 2 del
plásmido pSPL3b"

<220>
<221> exon
<222> 349..696
<223> /note="Exón constitutivo 1 del plásmido pSPL3b"

<220>
<221> exon
<222> 2856..3121
<223> /note="Exón constitutivo 2 del plásmido pSPL3b"

<220>

ES 2 470 440 B1

```

<221> misc_feature
<222> 1010..1015
<223> /note="Diana EcoRI de pSPL3b. Corte en posición 1011"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1117..1124
<223> /note="Diana NdeI de pSPL3b. Corte en posición 1119"

<220>
<221> misc_feature
<222> 690..704
<223> /note="Sitio donador de splicing del exón constitutivo 1 del
        plásmido pSPL3b"

<220>
<221> intron
<222> 697..2855
<223> /note="Intrón del plásmido pSPL3b"

<400> 1
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttattttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggg ttttgcaaaa agcttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggaccc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aaggtgctgg ctgccttcag      600
tgagggctctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtgggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tatcagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atgggggtacg ggatcaccag aattctggag     1020
ctcgagcggc cgctgcagga tcccagatat ctggtgatcc cgtacctgtg tggaaggaag     1080
caaccaccac tctattttgt gcatcagatg ctaaagcata tgatacagag gtacataatg     1140
tttgggccac acatgccggt gtaccacag accccaaccc acaagaagta gtattggtaa     1200
atgtgacaga aaattttaac atgtggaaaa atgacatggt agaacagatg catgaggata     1260
taatcagttt atgggatcaa agcctaaagc catgtgtaaa attaaccaca ccctgtccaa     1320
aggtatcctt tgagccaatt cccatacatt attgtgcccc ggctgggtttt gcgattctaa     1380
aatgtaataa taagacgttc aatggaacag gaccatgtac aaatgtcagc acagtacaat     1440
gtacacatgg aattaggcca gtagtatcaa ctcaactgct gttaaattggc agtctagcag     1500

```


ES 2 470 440 B1

aagaagaggt	agtaattaga	tctgtcaatt	tcacggacaa	tgctaaaacc	ataatagtag	1560
agctgaacac	atctgtagaa	attaattgta	caagacccaa	caacaatata	agaaaaaaaa	1620
tccgtatcca	gaggggacca	gggagagcat	ttgtttacaat	aggaaaaata	ggaaatatga	1680
gacaagcaca	ttgtaacatt	agtagagcaa	aatggaatgc	cactttaaaa	cagatagcta	1740
gcaaattaag	agaacaattt	ggaaataata	aaacaataat	ctttaagcaa	tcctcaggag	1800
gggacccaga	aattgtaacg	cacagtttta	attgtggagg	ggaatttttc	tactgtaatt	1860
caacacaact	gtttaatagt	acttggttta	atagtacttg	gagtactgaa	gggtcaaata	1920
acactgaagg	aagtgaacaca	atcacactcc	catgcagaat	aaaacaattt	ataaacatgt	1980
ggcaggaagt	aggaaaagca	atgtatgccc	ctcccatcag	cggacaaatt	agatgttcat	2040
caaataattac	agggctgcta	ttaacaagag	atgggtggtaa	taacaacaat	gggtccgaga	2100
tcttcagacc	tggaggagga	gatatgaggg	acaattggag	aagtgaatta	tataaatata	2160
aagtagtaaa	aattgaacca	ttaggagtag	caccaccaa	ggcaaagaga	agagtgggtgc	2220
agagagaaaa	aagagcagtg	ggaataggag	ctttgttcct	tgggttcttg	ggagcagcag	2280
gaagcactat	gggcgcagcg	tcaatgacgc	tgacggtaca	ggccagacaa	ttattgtctg	2340
gtatagtgca	gcagcagaac	aatttgctga	gggctattga	ggcgcaacag	catctgttgc	2400
aactcacagt	ctggggcatc	aagcagctcc	aggcaagaat	cctggctgtg	gaaagatacc	2460
taaaggatca	acagctcctg	gggatttggg	gttgctctgg	aaaactactt	tgcaccactg	2520
ctgtgccttg	gaatgctagt	tggagtaata	aatctctgga	acagatttgg	aatcacacga	2580
cgtggatgga	gtgggacaga	gaaattaaca	attacacaag	cttaatacac	tccttaattg	2640
aagaatcgca	aaaccagcaa	gaaaagaatg	aacaagaatt	attggaatta	gataaatggg	2700
caagtttgtg	gaattggttt	aacataacaa	attggctgtg	gtatataaaa	ttattcataa	2760
tgatagtagg	aggcttggtg	ggtttaagaa	tagtttttgc	tgtactttct	gtagtgaata	2820
gagttaggca	gggatattca	ccattatcgt	ttcagacctg	gagatctccc	gaggggaccc	2880
gacaggcccc	aaggaataga	agaagaaggt	ggagagagag	acagagacag	atccatttcg	2940
accaattcac	tcctcagggtg	caggctgcct	atcagaaggt	ggtggctggt	gtggccaatg	3000
ccctggctca	caaataccac	tgagatccag	acatgataag	atacattgat	gagtttggac	3060
aaaccacaac	tagaatgcag	tgaaaaaaat	gctttatttg	tgaaatttgt	gatgctattg	3120
ctttatttgt	aaccattata	agctgcaata	aacaagttaa	caacaacaat	tgcattcatt	3180
ttatgtttca	ggttcagggg	gaggtgtggg	aggtttttta	aagcaagtaa	aacctctaca	3240
aatgtgggtat	ggctgattat	gatccccagg	aagctcctct	gtgtcctcat	aaaccctaac	3300
ctcctctact	tgagaggaca	ttccaatcat	aggctgccca	tccaccctct	gtgtcctcct	3360
gttaattagg	tcacttaaca	aaaaggaaat	tgggtagggg	tttttcacag	accgctttct	3420
aagggttaatt	ttaaaatatc	tgggaagtcc	cttcactgc	tgtgttccag	aagtgttggt	3480
aaacagccca	caaattgtcaa	cagcagaaac	atacaagctg	tcagctttgc	acaagggccc	3540
aacaccctgc	tcatcaagaa	gcactgtggt	tgctgtgtta	gtaatgtgca	aaacaggagg	3600
cacattttcc	ccacctgtgt	aggttccaaa	atatctagtg	ttttcatttt	tacttggatc	3660

ES 2 470 440 B1

aggaacccag	cactccactg	gataagcatt	atccttatcc	aaaacagcct	tgtggtcagt	3720
gttcatctgc	tgactgtcaa	ctgtagcatt	ttttgggggt	acagtttgag	caggatattt	3780
ggtcctgtag	tttgctaaca	caccccaggt	ggcacttttc	ggggaaatgt	gcgcggaacc	3840
cctatttggt	tatttttcta	aatacattca	aatatgtatc	cgctcatgag	acaataaccc	3900
tgataaatgc	ttcaataata	ttgaaaaagg	aagagtatga	gtattcaaca	tttcctgtgc	3960
gcccttattc	ccttttttgc	ggcattttgc	cttcctgttt	ttgctcacc	agaaacgctg	4020
gtgaaagtaa	aagatgctga	agatcagttg	gggtgcacgag	tgggttacat	cgaactggat	4080
ctcaacagcg	gtaagatcct	tgagagtttt	cgccccgaag	aacgttttcc	aatgatgagc	4140
acttttaaag	ttctgctatg	tggcgcggtg	ttatcccgtg	ttgacgccgg	gcaagagcaa	4200
ctcggctgcc	gcatacacta	ttctcagaat	gacttggttg	agtactcacc	agtcacagaa	4260
aagcatctta	cggatggcat	gacagtaaga	gaattatgca	gtgctgccat	aacctgagt	4320
gataacactg	cggccaactt	acttctgaca	acgatcggag	gaccgaagga	gctaaccgct	4380
tttttgcaca	acatggggga	tcatgtaact	cgccttgatc	gttgggaacc	ggagctgaat	4440
gaagccatac	caaacgacga	gcgtgacacc	acgatgcctg	tagcaatggc	aacaacgttg	4500
cgcaaactat	taactggcga	actacttact	ctagcttccc	ggcaacaatt	aatagactgg	4560
atggaggcgg	ataaaagttg	aggaccactt	ctgcgctcgg	cccttcgggc	tggctggttt	4620
attgctgata	aatctggagc	cggtagcgt	gggtctcgcg	gtatcattgc	agcactgggg	4680
ccagatggta	agccctcccg	tatcgtagtt	atctacacga	cggggagtca	ggcaactatg	4740
gatgaacgaa	atagacagat	cgctgagata	gggtgcctcac	tgattaagca	ttggtaactg	4800
tcagaccaag	tttactcata	tatactttag	attgatttaa	aacttcattt	ttaatttaaa	4860
aggatctagg	tgaagatcct	ttttgataat	ctcatgacca	aaatccttaa	cggtagattt	4920
tcgttccact	gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaag	gatcttcttg	agatcctttt	4980
tttctgcgcg	taatctgctg	cttgcaaaca	aaaaaaccac	cgctaccagc	ggtaggtttgt	5040
ttgccggatc	aagagctacc	aactcttttt	ccgaaggtaa	ctggcttcag	cagagcgcag	5100
ataccaaata	ctgtccttct	agtgtagccg	tagttaggcc	accacttcaa	gaactctgta	5160
gcaccgccta	catacctcgc	tctgctaata	ctgttaccag	tggctgctgc	cagtggcgat	5220
aagtcgtgtc	ttaccgggtt	ggactcaaga	cgatagttag	cggataaggc	gcagcggctg	5280
ggctgaacgg	gggggttcgtg	cacacagccc	agcttgagac	gaacgaccta	caccgaactg	5340
agatacctac	agcgcgagca	ttgagaaagc	gccacgcttc	ccgaaggag	aaaggcggac	5400
aggtatccgg	taagcggcag	ggtcggaaca	ggagagcgca	cgaggagact	tccaggggga	5460
aacgcctggg	atcttttatag	tcctgtcggg	tttcgccacc	tctgacttga	gcgtcgattt	5520
ttgtgatgct	cgtcaggggg	gcggagccta	tggaaaaacg	ccagcaacgc	ggccttttta	5580
cggttcctgg	ccttttgctg	gccttttgct	cacatgttct	ttcctgcgtt	atcccctgat	5640
tctgtggata	accgtattac	cgcctttgag	tgagctgata	ccgctcgccg	cagccgaacg	5700
accgagcgca	gcgagtcagt	gagcgaggaa	gcggaagagc	gcccaatacg	caaaccgcct	5760

ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc ag

5792

<210> 2
<211> 505
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..505
<223> /mol_type="DNA"
/note="Gen lacZ (péptido alfa del gen de la β -Galactosidasa)
obtenido a partir del plásmido pBluescript II KS (-) más
mutagénesis dirigida de un sitio críptico aceptor de splicing"
/organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 370..372
<223> /note="Secuencia complementaria del codón de iniciación Met (ATG)
de lacZ"

<400> 2
taacgcttac aatttccatt cgccattcag gctgcgcaac tgttggaag ggcgatcggt 60
gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag 120
ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgagcgcgc 180
gtaatacgac tactatagg gcgaattgga gctccaccgc ggtggcggcc gctctagaac 240
tagtggatcc cccgggctgc aggaattcga tatcaagctt atcgataccg tcgacctcga 300
ggggggggccc ggtacccagc ttttgttccc ttttgtgagg gttaattgcy cgcttggcgt 360
aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca 420
tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat 480
taattgcgtt gcgctcactg cccgc 505

<210> 3
<211> 4993
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..4993
<223> /mol_type="DNA"
/note="Plásmido pSAD v5.0"
/organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> promoter
<222> 23..345
<223> /note="Promotor SV40"

<220>
<221> exon
<222> 349..696
<223> /note="Exón constitutivo 1"

<220>
<221> gene
<222> 1015..1519
<223> /note="Gen lacZ"

<220>

ES 2 470 440 B1

<221> misc_feature
<222> 1223..1330
<223> /note="Sitio de clonación múltiple"

<220>
<221> exon
<222> 2059..2323
<223> /note="Exón constitutivo 2"

<220>
<221> misc_feature
<222> 2038..2078
<223> /note="Sitio acceptor de splicing del exón constitutivo 2"

<220>
<221> gene
<222> 3139..3999
<223> /note="Gen de resistencia a ampicilina"

<220>
<221> misc_feature
<222> 690..704
<223> /note="Sitio donador de splicing del exón constitutivo 1"

<400> 3
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggcctccca 120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta 180
actccgcccc tcccggcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 240
ctaatttttt ttattttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300
tagtgaggag gctttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt 360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480
ggttgtctac ccatggaccc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa 540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag 600
tgaggggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca 660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720
tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780
catagtaatc atagaatata ggaaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tadcagcact 900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc 1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 1140
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200
cgactcacta tagggcgaaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260
atccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg 1320
gccccgtacc cagcttttgt tcccttttgt gaggggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat 1380

ES 2 470 440 B1

ggtcatagct	gtttcctgtg	tgaaattggt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	1440
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaattgagt	gagctaactc	acattaattg	1500
cgttgcgctc	actgcccgcc	atatgatata	gaggtacata	atgtttgggc	cacacatgcc	1560
ggtgtaccca	cagaccccaa	cccacaagaa	gtagtattgg	taaatgtgac	agaaaatfff	1620
aacatgtgga	aaaatgacat	ggtagaacag	atgcatgagg	atataatcag	tttatgggat	1680
caaagcctaa	agccatgtgt	aggaaaaacta	ctttgcacca	ctgctgtgcc	ttggaatgct	1740
agttggagta	ataaatctct	ggaacagatt	tggaatcaca	cgacctggat	ggagtgggac	1800
agagaaatta	acaattacac	aaacttaata	cactccttaa	ttgaagaatc	gcaaaaccag	1860
caagaaaaga	atgaacaaga	attattggaa	ttagataaat	gggcaagttt	gtggaattgg	1920
tttaacataa	caaattggct	gtggtatata	aaattattca	taatgatagt	aggaggcttg	1980
gtaggtttta	gaatagtttt	tgctgtactt	tctgtagtga	atagagttag	gcagggatat	2040
tcaccatttt	cttttcaggc	ctggagatct	cccgagggga	cccgcaggc	ccgaaggaat	2100
agaagaagaa	ggtggagaga	gagacagaga	cagatccatt	cgaccaattc	actcctcagg	2160
tgcaggctgc	ctatcagaag	gtggtggctg	gtgtggccaa	tgccctggct	cacaaatacc	2220
actgagatcc	agacatgata	agatacattg	atgagtttgg	acaaaccaca	actagaatgc	2280
agtgaaaaaa	atgctttatt	tgtgaaatff	gtgatgctat	tgctttatff	gtaaccatta	2340
taagctgcaa	taaacaagtt	aacaacaaca	attgcattca	ttttatgtff	caggttcagg	2400
gggaggtgtg	ggaggtttff	taaagcaagt	aaaacctcta	caaatgtggf	atggctgatt	2460
atgatcccca	ggaagctcct	ctgtgtcctc	ataaacctta	acctcctcta	cttgagagga	2520
cattccaatc	ataggctgcc	catccaccct	ctgtgtcctc	ctgttaatta	ggtcacttaa	2580
caaaaaggaa	attgggtagg	ggtttttcac	agaccgctff	ctaagggtaa	ttttaaaata	2640
tctgggaagt	cccttccact	gctgtgtttc	agaagtgttg	gtaaacagcc	cacaaatgtc	2700
aacagcagaa	acatacaagc	tgtcagctff	gcacaagggc	ccaacaccct	gctcatcaag	2760
aagcactgtg	gttgctgtgt	tagtaatgtg	caaaacagga	ggcacattff	ccccacctgt	2820
gtaggttcca	aaatatctag	tgttttcatt	tttacttgga	tcaggaacct	agcactccac	2880
tggataagca	ttatccttat	ccaaaacagc	cttgtgggtca	gtgttcatct	gctgactgtc	2940
aactgtagca	ttttttgggg	ttacagtttg	agcaggatat	ttggtcctgt	agtttgctaa	3000
cacaccccag	gtggcactff	tcggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatffg	tttatttttc	3060
taaatacatt	caaatatgta	tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	3120
tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttfff	3180
gcggcattff	gccttcctgt	ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	3240
gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtaaagtc	3300
cttgagagtt	ttcgccccga	agaacgtfff	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	3360
tgtggcgcg	tattatcccc	tattgacgcc	gggcaagagc	aactcggtcg	ccgcatacac	3420
tattctcaga	atgacttggf	tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	3480
atgacagtaa	gagaattatg	cagtgtctgc	ataaccatga	gtgataaac	tgcgccaac	3540

ES 2 470 440 B1

```

ttactttctga caacgatcgg aggaccgaat gagctaaccg cttttttgca caacatgggg 3600
gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 3660
gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc 3720
gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 3780
gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga 3840
gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 3900
cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 3960
atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca 4020
tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 4080
ctttttgata atctcatgac caaaatcctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 4140
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 4200
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac 4260
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 4320
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 4380
ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 4440
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt 4500
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 4560
tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggatccg gtaagcggca 4620
gggtcggaac aggagagcgc acgaggggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 4680
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 4740
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 4800
ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta 4860
ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag 4920
tgagcgagga agcggaagag cgccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga 4980
ttcattaatg cag 4993

```

```

<210> 4
<211> 4993
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..4993
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v6.0"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> promoter
<222> 23..345
<223> /note="Promotor SV40"

<220>
<221> exon

```

ES 2 470 440 B1

```

<222> 349..696
<223> /note="Exón constitutivo 1"

<220>
<221> gene
<222> 1015..1519
<223> /note="Gen lacZ"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1223..1330
<223> /note="Sitio de clonación múltiple"

<220>
<221> exon
<222> 2059..2323
<223> /note="Exón constitutivo 2"

<220>
<221> misc_feature
<222> 2038..2078
<223> /note="Sitio aceptor de splicing del exón constitutivo 2"

<220>
<221> gene
<222> 3139..3999
<223> /note="Gen de resistencia a ampicilina"

<220>
<221> misc_feature
<222> 690..704
<223> /note="Sitio donador de splicing del exón constitutivo 1"

<400> 4
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccgccctt aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gctttttttg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtg atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggaccc agagggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctg ctgccttcag      600
tgaggggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgccc tagaatcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tatcagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc     1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc     1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt     1140

```

ES 2 470 440 B1

aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	1200
cgactcacta	tagggcgaaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtgg	1260
atcccccggg	ctgcaggaat	tcgatatcaa	gcttatcgat	accgtcgacc	tcgagggggg	1320
gcccggtagc	cagcttttgt	tcccttttgt	gaggggttaat	tgcgcgcttg	gcgtaatcat	1380
ggatcatagc	gtttcctgtg	tgaattgtgt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	1440
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaattgagt	gagctaactc	acattaattg	1500
cgttgcgctc	actgcccgcc	atatgataca	gaggtacata	atgtttgggc	cacacatgcc	1560
ggtgtaccca	cagaccccaa	cccacaagaa	gtagtattgg	taaatgtgac	agaaaatttt	1620
aacatgtgga	aaaatgacat	ggtagaacag	atgcatgagg	atataatcag	tttatgggat	1680
caaagcctaa	agccatgtgt	aggaaaacta	ctttgcacca	ctgctgtgcc	ttggaatgct	1740
agttggagta	ataaatctct	ggaacagatt	tggaatcaca	cgacctggat	ggagtgggac	1800
agagaaatta	acaattacac	aaacttaata	cactccttaa	ttgaagaatc	gcaaaaccag	1860
caagaaaaga	atgaacaaga	attattggaa	ttagataaat	gggcaagttt	gtggaattgg	1920
tttaacataa	caaattggct	gtggtatata	aaattattca	taatgatagt	aggaggcttg	1980
gtaggtttta	gaatagtttt	tgctgtactt	tctgtagtga	atagagttag	gcagggatat	2040
tcaccatttt	cttttcaggc	ctggagatct	cccgagggga	cccgcaggc	ccgaagggaat	2100
agaagaagaa	ggtggagaga	gagacagaga	cagatccatt	cgaccaattc	actcctcagg	2160
tgcaggctgc	ctatcagaag	gtggtggctg	gtgtggccaa	tgccctggct	cacaaatacc	2220
actgagatcc	agacatgata	agatacattg	atgagtttgg	acaaaccaca	actagaatgc	2280
agtgaaaaaa	atgcttttatt	tgtgaaattt	gtgatgctat	tgctttattt	gtaaccatta	2340
taagctgcaa	taaacaagtt	aacaacaaca	attgcattca	ttttatgttt	caggttcagg	2400
gggagggtgtg	ggagggtttt	taaagcaagt	aaaacctcta	caaattgtgt	atggctgatt	2460
atgatcccca	ggaagctcct	ctgtgtcctc	ataaacctta	acctcctcta	cttgagagga	2520
cattccaatc	ataggctgcc	catccaccct	ctgtgtcctc	ctgttaatta	ggtcacttaa	2580
caaaaaggaa	attgggtagg	ggtttttcac	agaccgcttt	ctaagggtaa	ttttaaaata	2640
tctgggaagt	cccttcact	gctgtgttcc	agaagtgttg	gtaaacagcc	cacaaatgtc	2700
aacagcagaa	acatacaagc	tgtcagcttt	gcacaagggc	ccaacaccct	gctcatcaag	2760
aagcactgtg	gttgctgtgt	tagtaatgtg	caaaacagga	ggcacatttt	ccccacctgt	2820
gtaggttcca	aaatatctag	tgttttcatt	tttacttgga	tcaggaacct	agcactccac	2880
tggataagca	ttatccttat	ccaaaacagc	cttggtgtca	gtgttcatct	gctgactgtc	2940
aactgtagca	ttttttgggg	ttacagtttg	agcaggatat	ttggctcctgt	agtttgctaa	3000
cacacccccag	gtggcacttt	tcggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	3060
taaatacatt	caaatatgta	tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	3120
tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttttt	3180
gcggcatttt	gccttcctgt	ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	3240

ES 2 470 440 B1

```

gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc 3300
cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 3360
tgtggcgcggtg tattatccccg tattgacgcc gggcaagagc aactcgggtcg ccgcatacac 3420
tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 3480
atgacagtaa gagaattatg cagtgtctgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac 3540
ttactttctga caacgatcgg aggaccgaat gagctaaccg cttttttgca caacatgggg 3600
gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 3660
gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaaactggc 3720
gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 3780
gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga 3840
gccggtgagc gtgggtctcg cgggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 3900
cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 3960
atcgtcgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca 4020
tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 4080
ctttttgata atctcatgac caaaatcctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 4140
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 4200
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtgggtttg ttgcccggat caagagctac 4260
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 4320
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 4380
ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 4440
tggaactcaag acgatagtta ccggataagg cgagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt 4500
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 4560
tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggatccg gtaagcggca 4620
gggtcggaac aggagagcgc acgaggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 4680
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 4740
ggcggagcct atggaaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 4800
ggcctttttg tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta 4860
ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag 4920
tgagcgagga agcggaagag cgccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga 4980
ttcattaatg cag 4993

```

<210> 5

<211> 7849

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..7849

<223> /mol_type="DNA"

/note="Plásmido pSADv5.0 clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23 y

ES 2 470 440 B1

24 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 del gen BRCA2 de Homo sapiens"
/organism="Artificial Sequence"

```
<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1315,4181..7849)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"
```

```
<220>
<221> misc_feature
<222> 1316..4180
<223> /note="Exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24 y secuencias flanqueantes
de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 del gen BRCA2"
```

```
<220>
<221> misc_feature
<222> 1..7849
<223> /note="Minigen MGBR2_EX19-24"
```

```
<400> 5
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttattttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggaccc agagggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag      600
tgaggggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtgggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tatcagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc     1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc     1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt     1140
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata     1200
cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg     1260
atcccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa gcttatcgat accgtcgacc tcgagcacac     1320
atccggaata gcattaagaa cttgtagcag tataaacaat atgtttgaga agtactatat     1380
tgtgaaaata ttttcacttt tatacagttt ttactttatt tactgtctta ctaatcttcc     1440
taagactttt taaagtgaat atttttaagg cagttctaga agaataaaaa ctcttatgat     1500
```

ES 2 470 440 B1

atctgtaata	gaattgaata	catatttaac	tactaaatca	atatatttat	taatttgtcc	1560
agatttctgc	taacagtact	cggcctgctc	gctggataac	caaacttgga	ttctttcctg	1620
accctagacc	ttttcctctg	cccttatcat	cgcttttcag	tgatggagga	aatgttggtt	1680
gtgttgatgt	aattattcaa	agagcatacc	ctatacaggt	atgatgtatt	cttgaaactt	1740
accatatatt	tctttctttt	gatacaatta	atttgtttgt	ttgtttgaga	tggagtttcg	1800
gtctcttgcc	caggctggag	tgcaatggcg	tgatcttggt	tcactgcagc	ctccacctcc	1860
cgggttcaag	tgattctcct	gcctcagcct	ctcaagtagc	tgagccacca	cacctggcta	1920
attttgtatt	tttggttagag	aaggggtttc	atcatgttgg	tcaggctgat	ctcgaactcc	1980
tgacctcagg	tgatccacta	atctcagcct	cccaaagttc	tgggattaca	gatgtgagcc	2040
actgtgcctg	gcctgataca	attaacttga	atgttatata	tgtgactttt	ttggtgtgtg	2100
taacacatta	ttacagtggg	tggagaagac	atcatctgga	ttatacatat	ttcgcaatga	2160
aagagaggaa	gaaaaggaag	cagcaaaaata	tgtggaggcc	caacaaaaga	gactagaagc	2220
cttattcact	aaaattcagg	aggaatttga	agaacatgaa	ggtaaaatta	gttatatggt	2280
acacattggt	atttctaata	tgagaacaaa	gtcttagaga	ctttgaattt	aacattttta	2340
atgagtaa	at	ttgtttttatt	ttgagtagta	aattgacttt	at	2400
ttcttttttg	gtgttagaca	aagaatagca	acaagggaca	gaaatatcag	gtctaagcca	2460
tttgtaatcc	ttctttgggt	gttttatgct	tggttcttta	gttttagttg	cttttgaatt	2520
tacagtttag	tgaattaata	atccttttgt	tttcttagaa	aacacaacaa	aaccatattt	2580
accatcacgt	gcactaacaa	gacagcaagt	tcgtgctttg	caagatgggtg	cagagcttta	2640
tgaagcagtg	aagaatgcag	cagaccagc	ttaccttgag	gtgagagagt	aagaggacat	2700
ataatgaggc	ttgatgatta	ttcaagggtga	gaagctgttt	tagactctct	ggccatcaca	2760
ggaaggagta	tgttgaaatg	ctgcatttct	caaaagggat	gtgtacattt	ctgggatttt	2820
cagtgatgtg	ccagacgagt	gtggtggtat	gttttcaact	atataccgag	tagaggatgg	2880
gagggttcta	gaattttata	tattaattaa	atttggttta	aaatgcaggc	aaaacttggt	2940
tttagccatc	tgtaatgtag	ttggtgatga	ttatgattat	tagagtacat	ttataattgg	3000
aggatcattt	ttgccgtagg	gaaatagaat	tattaatagt	ttgaggcacc	tgagaatatt	3060
atgtgagaaa	ctgattacat	taaccacacc	cttaagatga	gctctaattt	tgttgtattt	3120
gtcctgttta	aagccatcta	gttacaatag	atggaacttt	ttgtttctga	ttgcttttta	3180
ttccaatatc	ttaa	atggtc	acagggttat	ttcagtgaag	agcagttaag	3240
aatcacaggc	aaatgttgaa	tgataagaaa	caagctcaga	tccagttgga	aattaggaag	3300
gccatggaat	ctgctgaaca	aaaggaacaa	ggtttatcaa	gggatgtcac	aaccgtgtgg	3360
aagttgcgta	ttgtaagcta	ttcaaaaaaa	gaaaaagatt	caggtaagta	tgtaaatgct	3420
ttgtttttat	cagttttatt	aacttaaaaa	atgaccttac	taacaaaatg	attataaatc	3480
cagataaagt	ataaagttag	tttatatcag	agaagcaaaa	tccactacta	atgccacaaa	3540
agagataata	taaaagagga	tctgtattta	ttttgaaaca	aacatttaaa	tgataatcac	3600
ttcttccatt	gcattctttct	catctttctc	caaacagtta	tactgagtat	ttggcgtcca	3660

ES 2 470 440 B1

tcacagatt	tataattctct	gttaacagaa	ggaaagagat	acagaattta	tcaccttgca	3720
acttcaaaat	ctaaaagtaa	atctgaaaga	gctaacatac	agttagcagc	gacaaaaaaa	3780
actcagtatc	aacaactacc	ggtaaaaacc	tttcattgta	atcttttcagt	tttgataagt	3840
gcttgtagt	ttatggaatc	tccatatgtt	gaatctttgt	tttgctttct	gtaggtttca	3900
gatgaaattt	tatttcagat	ttaccagcca	cgggagcccc	ttcacttcag	caaattttta	3960
gatccagact	ttcagccatc	ttgttctgag	gtggaccta	taggatttgt	cgcttctgtt	4020
gtgaaaaaaa	caggtaatgc	acaatatagt	taattttttt	tattgattct	tttaaaaaac	4080
attgtctttt	aaaatctctt	atgattagtt	ggagctacca	gttggaat	ttgctagcta	4140
actagtgatc	tgaaagtaag	cctctttgaa	cctctgattt	ggtacccagc	ttttgttccc	4200
ttttgtgagg	gttaattgag	cgcttgccgt	aatcatggc	atagctgttt	cctgtgtgaa	4260
attgttatcc	gctcacaatt	ccacacaaca	tacgagccg	aagcataaag	tgtaaacct	4320
ggggtgccta	atgagtgagc	taactcacat	taattgcgtt	gcgctcactg	cccgccatat	4380
gatacagagg	tacataatgt	ttgggccaca	catgccggtg	taccacaga	ccccaacca	4440
caagaagtag	tattggtaaa	tgtgacagaa	aattttaaca	tgtggaaaaa	tgacatggt	4500
gaacagatgc	atgaggatat	aatcagttta	tgggatcaaa	gcctaaagcc	atgtgtagga	4560
aaactacttt	gcaccactgc	tgtgccttgg	aatgctagtt	ggagtaataa	atctctggaa	4620
cagatttgga	atcacacgac	ctggatggag	tgggacagag	aaattaacaa	ttacacaaac	4680
ttaatacact	ccttaattga	agaatcgcaa	aaccagcaag	aaaagaatga	acaagaatta	4740
ttggaattag	ataaatgggc	aagtttgtgg	aattggttta	acataacaaa	ttggctgtgg	4800
tatatataat	tattcataat	gatagtagga	ggcttggtag	gtttaagaat	agtttttgct	4860
gtactttctg	tagtgaatag	agttaggcag	ggatattcac	cattttcttt	tcaggcctgg	4920
agatctccc	aggggacccg	acaggcccga	aggaatagaa	gaagaagggtg	gagagagaga	4980
cagagacaga	tccattcgac	caattcactc	ctcaggtgca	ggctgcctat	cagaagggtg	5040
tggctggtgt	ggccaatgcc	ctggctcaca	aataccactg	agatccagac	atgataagat	5100
acattgatga	gtttggacaa	accacaacta	gaatgcagt	aaaaaatgc	tttatttggtg	5160
aaatttggtg	tgctattgct	ttatttgtaa	ccattataag	ctgcaataaa	caagttaaca	5220
acaacaattg	cattcatttt	atgtttcagg	ttcaggggga	ggtgtgggag	gttttttaaa	5280
gcaagtaaaa	cctctacaaa	tgtggtatgg	ctgattatga	tcccaggaa	gctcctctgt	5340
gtcctcataa	accctaacct	cctctacttg	agaggacatt	ccaatcatag	gctgcccac	5400
caccctctgt	gtcctcctgt	taattagggtc	acttaacaaa	aaggaaattg	ggtaggggtt	5460
tttcacagac	cgctttctaa	gggtaatttt	aaaatatctg	ggaagtccct	tccactgctg	5520
tgttccagaa	gtgttggtaa	acagcccaca	aatgtcaaca	gcagaaacat	acaagctgtc	5580
agctttgcac	aaggggccaa	caccctgctc	atcaagaagc	actgtggttg	ctgtgttagt	5640
aatgtgcaaa	acaggaggca	cattttcccc	acctgtgtag	gttccaaaat	atctagtgtt	5700
ttcattttta	cttggtatcag	gaacccagca	ctccactgga	taagcattat	ccttatccaa	5760

ES 2 470 440 B1

aacagccttg	tggtcagtgt	tcatctgctg	actgtcaact	gtagcatttt	ttggggttac	5820
agtttgagca	ggatatttgg	tcctgtagtt	tgctaacaca	ccccaggtgg	cacttttcgg	5880
ggaaatgtgc	gcggaacccc	tatttgttta	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	5940
ctcatgagac	aataaccctg	ataaatgctt	caataatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	6000
attcaacatt	tccgtgtcgc	ccttattccc	ttttttgcgg	cattttgcct	tcctgttttt	6060
gctcacccag	aaacgctggg	gaaagtaaaa	gatgctgaag	atcagttggg	tgcacgagtg	6120
ggttacatcg	aactggatct	caacagcggg	aagatccttg	agagttttcg	ccccgaagaa	6180
cgttttccaa	tgatgagcac	ttttaaagtt	ctgctatgtg	gcgcgggtatt	atcccgtatt	6240
gacgccgggc	aagagcaact	cggtcgcgcg	atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	6300
tactcaccag	tcacagaaaa	gcatcttacg	gatggcatga	cagtaagaga	attatgcagt	6360
gctgccataa	ccatgagtga	taacactgcg	gccaacttac	ttctgacaac	gatcggagga	6420
ccgaatgagc	taaccgcttt	tttgcacaa	atgggggatc	atgtaactcg	ccttgatcgt	6480
tgggaaccgg	agctgaatga	agccatacca	aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctgta	6540
gcaatggcaa	caacgttgcg	caaactatta	actggcgaac	tacttactct	agcttcccgg	6600
caacaattaa	tagactggat	ggaggcggat	aaagttgcag	gaccacttct	gcgctcggcc	6660
cttccggctg	gctggtttat	tgctgataaa	tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcgcggg	6720
atcattgcag	cactggggcc	agatggtaag	ccctcccgtg	tcgtagttat	ctacacgacg	6780
gggagtcagg	caactatgga	tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	tgccctcactg	6840
attaagcatt	ggtaactgtc	agaccaagtt	tactcatata	tacttttagat	tgatttaaaa	6900
cttcattttt	aatttaaaaag	gatctaggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgacaaa	6960
atccttaacg	tgagttttcg	ttccactgag	cgtcagaccc	cgtagaaaag	atcaaaggat	7020
cttcttgaga	tccttttttt	ctgcgcgtaa	tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	7080
taccagcggg	ggtttggttg	ccggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	7140
gcttcagcag	agcgcagata	ccaaatactg	ttcttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	7200
acttcaagaa	ctctgtagca	ccgcctacat	acctcgctct	gctaatacctg	ttaccagtgg	7260
ctgctgccag	tggcgataag	tcgtgtctta	ccgggttgga	ctcaagacga	tagttaccgg	7320
ataaggcgca	gcggtcgggc	tgaacggggg	gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	7380
cgacctacac	cgaactgaga	tacctacagc	gtgagctatg	agaaagcgcc	acgcttcccg	7440
aaggggagaaa	ggcggacagg	tatccggtaa	gcggcagggg	cggaacagga	gagcgcacga	7500
gggagcttcc	aggggggaaac	gcctgggtatc	tttatagtcc	tgctcgggttt	cgccacctct	7560
gacttgagcg	tcgattttttg	tgatgctcgt	cagggggggcg	gagcctatgg	aaaaacgcca	7620
gcaacgcggc	cttttttacgg	ttcctggcct	tttgctggcc	ttttgctcac	atgttctttc	7680
ctgcgttatc	ccctgattct	gtggataacc	gtattaccgc	ctttgagtga	gctgataaccg	7740
ctcgccgcag	ccgaacgacc	gagcgcagcg	agtcagttag	cgaggaagcg	gaagagcgcc	7800
caatacgcaa	accgcctctc	cccgcgcgtt	ggccgattca	ttaatgcag		7849

ES 2 470 440 B1

```

<210> 6
<211> 8796
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..8796
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23,
      24 y 25 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21,
      22, 23, 24 y 25 del gen BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1316..5127
<223> /note="Exones 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 y secuencias
      flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 del
      gen BRCA2"

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1315,5128..8796)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..8796
<223> /note="Minigen MGBR2_EX19-25"

<400> 6
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtcgccag gtcgccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcgcc aggcctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttattttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggaccc agagggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag      600
tgagggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa taccagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc      1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cggtgcgggc      1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt      1140
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata      1200

```

ES 2 470 440 B1

cgactcacta	tagggcggaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtgg	1260
atcccccggg	ctgcaggaat	tcgatatcaa	gcttatcgat	accgtcgacc	tcgagcacac	1320
atccggaata	gcattaagaa	cttgtagcag	tataaacaat	atgtttgaga	agtactatat	1380
tgtgaaaata	ttttcacttt	tatacagttt	tttacttatt	tactgtctta	ctaattcttc	1440
taagactttt	taaagtgaat	atttttaagg	cagttctaga	agaatgaaaa	ctcttatgat	1500
atctgtaata	gaattgaata	catatttaac	tactaaatca	atatatttat	taatttgtcc	1560
agatttctgc	taacagtact	cggcctgctc	gctggataac	caaacttgga	ttctttcctg	1620
accctagacc	ttttcctctg	cccttatcat	cgcttttcag	tgatggagga	aatgttggtt	1680
gtgttgatgt	aattattcaa	agagcatacc	ctatacaggt	atgatgtatt	cttgaaactt	1740
accatatatt	tctttctttt	gatacaatta	atgtgtttgt	ttgtttgaga	tggagtttcg	1800
gtctcttgcc	caggctggag	tgcaatggcg	tgatcttggt	tcactgcagc	ctccacctcc	1860
cgggttcaag	tgattctcct	gcctcagcct	ctcaagtagc	tgagccacca	cacctggcta	1920
attttgtatt	tttggtagag	aaggggtttc	atcatgttgg	tcaggctgat	ctcgaactcc	1980
tgacctcagg	tgatccacta	atctcagcct	cccaaagttc	tgggattaca	gatgtgagcc	2040
actgtgcctg	gcctgataca	attaacttga	atgttatata	tgtgactttt	ttggtgtgtg	2100
taacacatta	ttacagtgga	tggagaagac	atcatctgga	ttatacatat	ttcgcaatga	2160
aagagaggaa	gaaaaggaag	cagcaaaaata	tgtggaggcc	caacaaaaga	gactagaagc	2220
cttattcact	aaaattcagg	aggaatttga	agaacatgaa	ggtaaaatta	gttatatggt	2280
acacattggt	attttctaata	tgagaacaaa	gtcttagaga	ctttgaattt	aacattttta	2340
atgagtaaata	tggtttttatt	ttgagtagta	aattgacttt	attttttagt	atctagggta	2400
ttcttttttg	gtgttagaca	aagaatagca	acaagggaca	gaaatatcag	gtctaagcca	2460
tttgtaatcc	ttctttgggt	gttttatgct	tggttcttta	gttttagttg	cttttgaatt	2520
tacagtttag	tgaattaata	atccttttgt	tttcttagaa	aacacaacaa	aaccatattt	2580
accatcacgt	gcactaacaa	gacagcaagt	tcgtgctttg	caagatggtg	cagagcttta	2640
tgaagcagtg	aagaatgcag	cagaccagc	ttaccttgag	gtgagagagt	aagaggacat	2700
ataatgaggc	ttgatgatta	ttcaagggtga	gaagctgttt	tagactctct	ggccatcaca	2760
ggaaggagta	tggtgaaatg	ctgcatttct	caaaagggat	gtgtacattt	ctgggatttt	2820
cagtgtatgtg	ccagacgagt	gtggtggtat	gttttcaact	atataccgag	tagaggatgg	2880
gagggttcta	gaattttata	tattaattaa	atgtgtttta	aaatgcaggc	aaaacttggt	2940
tttagccatc	tgtaatgtag	ttggtgatga	ttatgattat	tagagtacat	ttataattgg	3000
aggatcattt	ttgccgtagg	gaaaatagaat	tattaatagt	ttgaggcacc	tgagaatatt	3060
atgtgagaaa	ctgattacat	taaccacacc	cttaagatga	gctctaattt	tgttgtattt	3120
gtcctgttta	aagccatcta	gttacaatag	atggaacttt	tttgttctga	ttgcttttta	3180
ttccaatatc	ttaaattgggtc	acaggggttat	ttcagtgaag	agcagttaag	agccttgaat	3240
aatcacaggc	aaatgttgaa	tgataagaaa	caagctcaga	tccagttgga	aattaggaag	3300

ES 2 470 440 B1

gccatggaat	ctgctgaaca	aaaggaacaa	ggtttatcaa	gggatgtcac	aaccgtgtgg	3360
aagttgcgta	ttgtaagcta	ttcaaaaaaa	gaaaaagatt	caggtaagta	tgtaaatgct	3420
ttgtttttat	cagtttttatt	aacttaaaaa	atgaccttac	taacaaaatg	attataaatc	3480
cagataaagt	ataaagttag	tttatatcag	agaagcaaaa	tccactacta	atgccacaaa	3540
agagataata	taaaagagga	tctgtattta	ttttgaaaca	aacatttaaa	tgataatcac	3600
ttctttccatt	gcatctttct	catctttctc	caaacagtta	tactgagtat	ttggcgtcca	3660
tcatcagatt	tatattctct	gttaacagaa	ggaaagagat	acagaattta	tcatcttgca	3720
acttcaaaat	ctaaaagtaa	atctgaaaga	gctaacatac	agttagcagc	gacaaaaaaa	3780
actcagtatc	aacaactacc	ggtaaaaacc	tttcattgta	atttttcagt	tttgataagt	3840
gcttggttagt	ttatggaatc	tccatatgtt	gaatttttgt	tttgttttct	gtaggtttca	3900
gatgaaatth	tattttcagat	ttaccagcca	cgggagcccc	ttcacttcag	caaattttta	3960
gatccagact	ttcagccatc	ttgttctgag	gtggaccta	taggatttgt	cgtttctgtt	4020
gtgaaaaaaa	caggtaatgc	acaatatagt	taattttttt	tattgattct	tttaaaaaac	4080
attgtctttt	aaaatctctt	atgattagtt	ggagctacca	gttggcaaat	ttgctagcta	4140
actagtgatc	tgaaagtaag	cctctttgaa	cctctgattt	aatctgtact	cctgttagca	4200
atgtgtgcgt	atacctgctt	ccacatgacc	tcagtaaaa	aatgtgttgt	catattggta	4260
ttgaaattht	agcactgtaa	gcaacaggtc	atthttgaaa	acctgagctt	tcgccaaatt	4320
cagctattht	gattttgctt	tattattagc	atataccaaa	ataaataggc	atattagagt	4380
ttcctttctt	gcatcttaaa	attcatctaa	cacatctata	ataacattct	tttctttttt	4440
ttccattcta	ggacttgccc	ctttcgtcta	tttgtcagac	gaatgttaca	atttactggc	4500
aataaagtht	tggatagacc	ttaatgagga	cattattaag	cctcatatgt	taattgctgc	4560
aagcaacctc	cagtggcgac	cagaatccaa	atcaggcctt	cttactttat	ttgctggaga	4620
tttttctgtg	ttttctgcta	gtccaaaaga	gggccacttt	caagagacat	tcaacaaaat	4680
gaaaaatact	gttgaggtaa	ggttacttht	cagcatcacc	acacatttht	gtattthtct	4740
atthttgacag	tccagtatca	aggaaatagc	ttttatacaa	attggatagt	tgaggtagta	4800
tgtgaggtaa	agthtaata	tatattaatt	gccccatga	ctcaggagat	gggggaatgg	4860
ggaaatgaca	gcaactagaa	agagaagaat	gacttgaagg	gaaatgagtt	aggagaaatt	4920
gtgagaagga	tgthtcagaaa	tgcaacttht	gtaagcaaac	tggaaattgg	ttacaagaat	4980
aatatgagth	atctgtggth	tgcaagcagtc	agcagtgth	ttagthtaata	atatagagac	5040
tacaggthta	cattthaaact	ccatatctag	tgthttatac	agattatatt	tctthtgactt	5100
gattthaatcc	cagataagag	acactgaggt	accagcttht	tgthcccttht	tgtgagggtt	5160
aattgcgcgc	ttggcgtaat	catggtcata	gctgtthcct	gtgtgaaatt	gttatccgct	5220
cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	cataaagtht	aaagcctggg	gtgcctaattg	5280
agtgagctaa	ctcacattaa	ttgcgttgcg	ctcactgccc	gccatagat	acagaggtag	5340
ataatgthttg	ggccacacat	gccggtgtac	ccacagaccc	caaccacaaa	gaagtagtat	5400
tggtaaatgt	gacagaaaat	tttaacatgt	ggaaaaatga	catggtagaa	cagatgcatg	5460

ES 2 470 440 B1

aggatataat	cagtttatgg	gatcaaagcc	taaagccatg	tgtaggaaaa	ctactttgca	5520
ccactgctgt	gccttggaat	gctagttgga	gtaataaatc	tctggaacag	atttggaatc	5580
acacgacctg	gatggagtg	gacagagaaa	ttaacaatta	cacaaactta	atacactcct	5640
taattgaaga	atcgcaaaac	cagcaagaaa	agaatgaaca	agaattattg	gaattagata	5700
aatgggcaag	tttgtggaat	tggtttaaca	taacaaattg	gctgtggtat	ataaaattat	5760
tcataatgat	agtaggaggg	ttggtaggtt	taagaatagt	ttttgctgta	ctttctgtag	5820
tgaatagagt	taggcagggg	tattcaccat	tttcttttca	ggcctggaga	tctcccagg	5880
ggacccgaca	ggcccgaagg	aatagaagaa	gaaggtggag	agagagacag	agacagatcc	5940
attcgaccaa	ttcactcctc	aggtgcaggc	tgcctatcag	aaggtggtgg	ctggtgtggc	6000
caatgccctg	gctcacaaat	accactgaga	tccagacatg	ataagataca	ttgatgagtt	6060
tggacaaacc	acaactagaa	tgcaagtga	aaaatgcttt	atttgtgaaa	tttgtgatgc	6120
tattgcttta	tttgtaacca	ttataagctg	caataaaca	gttaacaaca	acaattgcat	6180
tcattttatg	tttcaggttc	agggggagg	gtgggagggt	ttttaagca	agtaaacct	6240
ctacaaatgt	ggtatggctg	attatgatcc	ccaggaagct	cctctgtgtc	ctcataaacc	6300
ctaacctcct	ctacttgaga	ggacattcca	atcataggct	gcccattcac	cctctgtgtc	6360
ctcctgttaa	ttaggtcact	taacaaaaag	gaaattgggt	aggggttttt	cacagaccgc	6420
tttctaaggg	taattttaaa	atatctggga	agtcccttcc	actgctgtgt	tccagaagtg	6480
ttggtaaaca	gcccacaaat	gtcaacagca	gaaacataca	agctgtcagc	tttgcaaac	6540
ggcccaacac	cctgtcatc	aagaagcact	gtggttgctg	tgtagtaat	gtgcaaaaca	6600
ggaggcacat	tttccccacc	tgtgtaggtt	ccaaaatatc	tagtgttttc	atttttactt	6660
ggatcaggaa	cccagcactc	cactggataa	gcattatcct	tatccaaaac	agccttgtgg	6720
tcagtgttca	tctgtgact	gtcaactgta	gcattttttg	gggttacagt	ttgagcagga	6780
tatttggtcc	tgtagtttgc	taacacaccc	caggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	6840
gaacccctat	ttgtttat	ttctaaatac	attcaaatac	gtatccgctc	atgagacaat	6900
aaccctgata	aatgcttcaa	taatattgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	6960
gtgtcgccct	tattcccttt	tttgcgcat	tttgccctcc	tgtttttgct	caccagaaa	7020
cgctggtgaa	agtaaaaagat	gctgaagatc	agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaac	7080
tggatctcaa	cagcggtaag	atccttgaga	gttttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	7140
tgagcacttt	taaagtctg	ctatgtggcg	cggtattatc	ccgtattgac	gccgggcaag	7200
agcaactcgg	tcgccgcata	cactattctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	7260
cagaaaagca	tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgct	gccataacca	7320
tgagtgataa	cactgcggcc	aacttacttc	tgacaacgat	cggaggaccg	aatgagctaa	7380
ccgctttttt	gcacaacatg	ggggatcatg	taactcgctc	tgatcgttgg	gaaccggagc	7440
tgaatgaagc	cataccaaac	gacgagcgtg	acaccacgat	gcctgtagca	atggcaacaa	7500
cgttgcgcaa	actattaact	ggcgaactac	ttactctagc	ttcccggcaa	caattaatag	7560

ES 2 470 440 B1

```

actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct 7620
ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac 7680
tggggccaga tggttaagccc tcccgtatcg tagttatcta cagcacgggg agtcaggcaa 7740
ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt 7800
aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catTTTTaat 7860
ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaatac cttaacgtga 7920
gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc 7980
tttttttctg cgcgtaaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt 8040
ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc 8100
gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc 8160
tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg 8220
cgataagtcg tgtcttaccg gggtggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg 8280
gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga 8340
actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc 8400
ggacaggtat ccggttaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg 8460
gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg 8520
atttttgatg tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt 8580
tttacgggtc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc 8640
tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg 8700
aacgaccgag cgcagcgagt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc 8760
gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcag 8796

```

```

<210> 7
<211> 9628
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..9628
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23,
      24, 25 y 26 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20,
      21, 22, 23, 24, 25 y 26 del gen BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1316..5959
<223> /note="Exones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 y secuencias
      flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26
      del gen BRCA2"

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1315,5960..9628)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>
<221> misc_feature

```

ES 2 470 440 B1

<222> 1..9628

<223> /note="Minigen MGBR2_EX19-26"

<400> 7

```

ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggcctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcca tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggaccc agagggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag      600
tgagggctctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tatcagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc     1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cggtgcgggc     1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt     1140
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata     1200
cgactcacta tagggcgaaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg     1260
atcccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa gcttatcgat accgtcgacc tcgagcacac     1320
atccggaata gcattaagaa cttgtagcag tataaacaat atgtttgaga agtactatat     1380
tgtgaaaata ttttcacttt tatacagttt tttacttatt tactgtctta ctaatcttcc     1440
taagactttt taaagtgaat atttttaagg cagtcttaga agaataaaaa ctcttatgat     1500
atctgtaata gaattgaata catatttaac tactaaatca atatatttat taatttgtcc     1560
agatttctgc taacagtact cggcctgctc gctgggtatac caaacttgga ttctttcctg     1620
accctagacc ttttcctctg cccttatcat cgcttttcag tgatggagga aatgttggtt     1680
gtgttgatgt aattattcaa agagcatacc ctatacaggt atgatgtatt cttgaaactt     1740
accatatatt tctttctttt gatacaatta atttgtttgt ttgtttgaga tggagtttcg     1800
gtctcttgcc caggctggag tgcaatggcg tgatcttggg tctactgcagc ctccacctcc     1860
cgggttcaag tgattctcct gcctcagcct ctcaagtagc tgagccacca cacctggcta     1920
attttgtatt tttggtagag aaggggtttc atcatgttgg tcaggctgat ctcgaactcc     1980
tgacctcagg tgatccacta atctcagcct cccaaagtgc tgggattaca gatgtgagcc     2040

```

ES 2 470 440 B1

actgtgcctg	gcctgataca	attaacttga	atgttatata	tgtgactttt	ttggtgtgtg	2100	
taacacatta	ttacagtgga	tggagaagac	atcatctgga	ttatacatat	ttcgcaatga	2160	
aagagaggaa	gaaaagggaag	cagcaaaaata	tgtggaggcc	caacaaaaga	gactagaagc	2220	
cttattcact	aaaattcagg	aggaatttga	agaacatgaa	ggtaaaatta	gttatatggt	2280	
acacattggt	atttctaata	tgagaacaaa	gtcttagaga	ctttgaattt	aacattttta	2340	
atgagtaa	at	ttgagtagta	aattgacttt	at	tttttttagt	atctagggta	2400
ttcttttttg	gtgttagaca	aagaatagca	acaagggaca	gaaatatcag	gtctaagcca	2460	
tttgtaatcc	ttctttgggt	gttttatgct	tggttcttta	gttttagttg	cttttgaatt	2520	
tacagtttag	tgaattaata	atccttttgt	tttcttagaa	aacacaacaa	aaccatattt	2580	
accatcacgt	gcactaacaa	gacagcaagt	tcgtgctttg	caagatgggtg	cagagcttta	2640	
tgaagcagtg	aagaatgcag	cagacccagc	ttaccttgag	gtgagagagt	aagaggacat	2700	
ataatgaggc	ttgatgatta	ttcaagggtga	gaagctgttt	tagactctct	ggccatcaca	2760	
ggaaggagta	tgttgaaatg	ctgcatttct	caaaagggat	gtgtacattt	ctgggatttt	2820	
cagtgatgtg	ccagacgagt	gtggtggtat	gttttcaact	atataccgag	tagaggatgg	2880	
gagggttcta	gaattttata	tattaattaa	atttggttta	aaatgcaggc	aaaacttggt	2940	
tttagccatc	tgtaatgtag	ttggtgatga	ttatgattat	tagagtacat	ttataattgg	3000	
aggatcattt	ttgccgtagg	gaaatagaat	tattaatagt	ttgaggcacc	tgagaatatt	3060	
atgtgagaaa	ctgattacat	taaccacacc	cttaagatga	gctctaattt	tgttgtattt	3120	
gtcctgttta	aagccatcta	gttacaatag	atggaacttt	tttgttctga	ttgcttttta	3180	
ttccaatatc	ttaa	atgggtc	acagggttat	ttcagtgaag	agcagttaag	agccttgaat	3240
aatcacaggc	aaatgttgaa	tgataagaaa	caagctcaga	tccagttgga	aattaggaag	3300	
gccatggaat	ctgctgaaca	aaaggaacaa	ggtttatcaa	gggatgtcac	aaccgtgtgg	3360	
aagttgcgta	ttgtaagcta	ttcaaaaaaa	gaaaaagatt	caggtaagta	tgtaaatgct	3420	
ttgtttttat	cagttttatt	aacttaaaaa	atgaccttac	taacaaaatg	attataaatc	3480	
cagataaagt	ataaagttag	tttatatcag	agaagcaaaa	tccactacta	atgccacaa	3540	
agagataata	taaaagagga	tctgtattta	ttttgaaaca	aacatttaaa	tgataatcac	3600	
ttcttccatt	gcatctttct	catctttctc	caaacagtta	tactgagtat	ttggcgtcca	3660	
tcatcagatt	tatattctct	gttaacagaa	ggaaagagat	acagaattta	tcatcttgca	3720	
acttcaaaat	ctaaaagtaa	atctgaaaga	gctaacatac	agttagcagc	gacaaaaaaa	3780	
actcagtatc	aacaactacc	ggtacaaacc	tttcattgta	at	tttttcagt	tttgataagt	3840
gcttggttagt	ttatggaatc	tccatatgtt	gaatttttgt	tttgttttct	gtaggtttca	3900	
gatgaaat	at	ttttcagat	ttaccagcca	cgggagcccc	ttcacttcag	caaattttta	3960
gatccagact	ttcagccatc	ttgttctgag	gtggacctaa	taggatttgt	cgtttctggt	4020	
gtgaaaaaaa	caggtaatgc	acaatatagt	taattttttt	tattgattct	tttaaaaaac	4080	
attgtctttt	aaaatctctt	atgattagtt	ggagctacca	gttgqcaaat	ttgctaagcta	4140	

ES 2 470 440 B1

actagtgatc	tgaaagtaag	cctctttgaa	cctctgattt	aatctgtact	cctgttagca	4200
atgtgtgCGT	atacctgctt	ccacatgacc	tcagtaaaaag	aatgtgttgt	catattggta	4260
ttgaaatttt	agcactgtaa	gcaacaggtc	attttggaag	acctgagctt	tcgccaaatt	4320
cagctatttt	gatttgcttt	tattattagc	atataccaaa	ataaataggc	atattagagt	4380
ttccttttct	gcatcttaaa	attcatctaa	cacatctata	ataacattct	tttctttttt	4440
ttccattcta	ggacttgccc	ctttcgctta	tttgtcagac	gaatgttaca	atttactggc	4500
aataaagttt	tggatagacc	ttaatgagga	cattattaag	cctcatatgt	taattgctgc	4560
aagcaacctc	cagtggcgac	cagaatccaa	atcaggcctt	cttactttat	ttgctggaga	4620
tttttctgtg	ttttctgcta	gtccaaaaga	gggccacttt	caagagacat	tcaacaaaat	4680
gaaaaatact	gttgaggtaa	ggttactttt	cagcatcacc	acacattttg	gtatttttct	4740
attttgacag	tccagtatca	aggaaatagc	ttttatacaa	attggatagt	tgaggtagta	4800
tgtgaggtaa	agtttaaatca	tatattaatt	gcccatgaac	ctcaggagat	gggggaatgg	4860
ggaaatgaca	gcaactagaa	agagaagaat	gacttgaagg	gaaatgagtt	aggagaaatt	4920
gtgagaagga	tggttcagaaa	tgcagacttt	gtaagcaaac	tggaaattgg	ttacaagaat	4980
aatatgagtt	atctgtgggt	tgcagcagtc	agcagtgtga	ttagttaata	atatagagac	5040
tacaggttta	catttaaact	ccatatctag	tgttttatac	agattatatt	tctttgactt	5100
gatttaatcc	cagataagag	acactgaggt	accagtaaat	agagctagga	cttgagcccc	5160
aatcttccag	cttcaatcca	gatcatatga	cagcttgctg	attaaactag	atgacagaga	5220
agatctcttt	ccttcagata	cacatacttt	ttctctgttc	ccctctccct	atcagctaga	5280
ttcccctaaa	tactgatac	tggttttgta	attttgcata	ggcatgtttg	acaattggta	5340
tcacatttag	ggtttttcat	tcttttttgg	tccaaacttt	tcatttctgc	ttttaaaagga	5400
aatacttttg	gaaacataaa	tatgtggggt	tgcaatttat	aaagcagctt	ttccacttat	5460
tttcttagaa	tattgacata	ctttgcaatg	aagcagaaaa	caagcttatg	catatactgc	5520
atgcaaata	tccaagtgg	tccaccccaa	ctaaagactg	tacttcaggg	ccgtacactg	5580
ctcaaatcat	tcctgggtaca	ggaaacaagc	ttctggtaag	ttaatgtaaa	ctcaaggaat	5640
attataagaa	gtatatatgg	aggccatcgt	atattctgtt	gtatacctag	taaacatggt	5700
aaaatgtaat	taaacttaat	tagaaaatgt	ggttggtatg	tggctcctgt	aagtatagtt	5760
athtagaaat	tttatttatt	gaagcaagat	atgaaactct	gggtgcacac	tttccaaaca	5820
ggtgctttca	tttacctgtg	attgaaaagt	gttttttgtc	atttatttca	ctgttccata	5880
caattagggg	tgtttctaag	ctgtttgtaa	gctgtttcta	agctatttaa	gtgggttaa	5940
cacagtagat	gcaaatcaag	gtaccagct	tttgttcctt	tttgtgaggg	ttaattgctg	6000
gcttgccgta	atcatgggtca	tagctgtttc	ctgtgtgaaa	ttgttatccg	ctcacaattc	6060
cacacaacat	acgagccgga	agcataaagt	gtaaagcctg	gggtgcctaa	tgagttagct	6120
aactcacatt	aattgcgttg	cgctcactgc	ccgccatatg	atacagaggt	acataatggt	6180
tgggccacac	atgccggtgt	accacagac	cccaaccac	aagaagtagt	attggtaa	6240
gtgacagaaa	attttaacat	gtggaaaaat	gacatggtag	aacagatgca	tgaggatata	6300

ES 2 470 440 B1

atcagtttat	gggatcaaa	g	cctaaagcca	tgtgtaggaa	aactactttg	caccactgct	6360	
gtgccttgga	atgctagttg	g	gagtaataaa	tctctggaac	agatttgga	tcacacgacc	6420	
tggatggagt	gggacagaga	a	aattaacaat	tacacaaact	taatacactc	cttaattgaa	6480	
gaatcgcaaa	accagcaaga	a	aaagaatgaa	caagaattat	tggaattaga	taaatgggca	6540	
agtttgtgga	attggtttaa	c	cataacaaat	tggctgtggg	atataaaatt	attcataatg	6600	
atagtaggag	gcttggtagg	t	ttaagaata	gtttttgctg	tactttctgt	agtgaataga	6660	
gttaggcagg	gatattcacc	a	tttttctttt	caggcctgga	gatctcccga	ggggacccga	6720	
caggcccgaa	ggaatagaag	a	agaaggtgg	agagagagac	agagacagat	ccattcgacc	6780	
aattcactcc	tcagggtgcag	g	ctgcctatc	agaaggtggg	ggctgggtgtg	gccaatgccc	6840	
tggctcacia	ataccactga	g	atccagaca	tgataagata	cattgatgag	tttgacaaa	6900	
ccacaactag	aatgcagtga	a	aaaaaatgct	ttatttgtga	aatttgtgat	gctattgctt	6960	
tatttgtaac	cattataagc	t	gcaataaac	aagttaacaa	caacaattgc	attcatttta	7020	
tgtttcaggt	tcagggggag	g	tggtgggagg	ttttttaaa	g	caagtaaaac	ctctacaaat	7080
gtggtatggc	tgattatgat	c	cccaggaag	ctcctctgtg	tcctcataaa	ccctaacctc	7140	
ctctacttga	gaggacattc	c	aatcatagg	ctgcccattc	accctctgtg	tcctcctgtt	7200	
aattaggtca	cttaacaaaa	a	ggaaattgg	gtaggggttt	ttcacagacc	gctttctaag	7260	
ggtaatttta	aaatatctgg	g	gaagtccctt	ccactgctgt	gttccagaag	tggttgtaaa	7320	
cagcccacia	atgtcaacag	c	agaaacata	caagctgtca	gctttgcaca	agggcccaac	7380	
accctgctca	tcaagaagca	c	tggtggttgc	tgtgttagta	atgtgcaaaa	caggaggcac	7440	
attttcccca	cctgtgtagg	t	tccaaaaata	tctagtgttt	tcatttttac	ttggatcagg	7500	
aaccagcac	tccactggat	a	agcattatc	cttatccaaa	acagccttgt	ggtcagtgtt	7560	
catctgctga	ctgtcaactg	t	agcattttt	tggggttaca	gtttgagcag	gatatttggt	7620	
cctgtagttt	gctaacacac	c	ccaggtggc	acttttcggg	gaaatgtgcg	cggaaccctt	7680	
atttgtttat	ttttctaaat	a	cattcaaat	atgtatccgc	tcattgagaca	ataaccctga	7740	
taaatgcttc	aataatattg	a	aaaaggaag	agtatgagta	ttcaacattt	ccgtgtcgcc	7800	
cttattccct	tttttgcggc	a	ttttgcctt	cctgtttttg	ctcaccaga	aacgctggtg	7860	
aaagtaaaag	atgctgaaga	t	cagttgggt	gcacgagtgg	gttacatcga	actggatctc	7920	
aacagcggtg	agatccttga	g	agtttttcgc	cccgaagaac	gttttccaat	gatgagcact	7980	
tttaaagttc	tgctatgtgg	c	gcggtatta	tcccgtattg	acgccgggca	agagcaactc	8040	
ggtcgccgca	tacactattc	t	cagaatgac	ttgggttagt	actcaccagt	cacagaaaag	8100	
catcttacgg	atggcatgac	a	gtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	catgagtgat	8160	
aacactgcgg	ccaacttact	t	ctgacaacg	atcggaggac	cgaatgagct	aaccgctttt	8220	
ttgcacaaca	tgggggatca	t	gtaactcgc	cttgatcggt	gggaaccgga	gctgaatgaa	8280	
gccataccaa	acgacgagcg	t	gacaccacg	atgcctgtag	caatggcaac	aacgttgcg	8340	
aaactattaa	ctggcggaact	a	cttactcta	gcttcccggc	aacaattaat	agactggatg	8400	

ES 2 470 440 B1

```

gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt 8460
gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca 8520
gatggttaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat 8580
gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca 8640
gaccaagttt actcatatat acttttagatt gatttaaaac ttcatTTTTa atttaaaagg 8700
atctagggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tccttaacgt gagttttcgt 8760
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc 8820
tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaaa aaccaccgct accagcgggtg gtttgtttgc 8880
cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 8940
caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 9000
cgcttacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 9060
cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct 9120
gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 9180
acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt 9240
atccggttaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg 9300
cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 9360
gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt 9420
tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgctctttcc tgcgttatcc cctgattctg 9480
tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg 9540
agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc 9600
ccgcgcgttg gccgattcat taatgcag 9628

```

```

<210> 8
<211> 9820
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..9820
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 19,20,21,22,23,24,
      25,26 y 27 y secuencias flanqueantes de los intrones 18,19,20,21,
      22,23,24,25 y 26 del gen BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1316..6935
<223> /note="Exones 19,20,21,22,23,24,25,26 y 27 y secuencias
      flanqueantes de los intrones 18,19,20,21,22,23,24,25 y 26 del gen
      BRCA2"

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1315,6936..9820)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>
<221> misc_feature

```

ES 2 470 440 B1

<222> 1..9793

<223> /note="Minigen MGBR2_EX19-27"

<400> 8

```

ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcca tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggaccc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag      600
tgagggctctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tatcagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc     1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc     1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt     1140
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata     1200
cgactcacta tagggcgaaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg     1260
atcccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa gcttatcgat accgtcgacc tcgagcacac     1320
atccggaata gcattaagaa cttgtagcag tataaacaat atgtttgaga agtactatat     1380
tgtgaaaata ttttcacttt tatacagttt tttacttatt tactgtctta ctaatcttcc     1440
taagactttt taaagtgaat atttttaagg cagttctaga agaataaaaa ctcttatgat     1500
atctgtaata gaattgaata catatttaac tactaaatca atatatttat taatttgtcc     1560
agatttctgc taacagtact cggcctgctc gctgggtatac caaacttgga ttctttcctg     1620
accctagacc ttttcctctg cccttatcat cgcttttcag tgatggagga aatgttggtt     1680
gtgttgatgt aattattcaa agagcatacc ctatacaggt atgatgtatt cttgaaactt     1740
accatatatt tctttctttt gatacaatta atttgtttgt ttgtttgaga tggagtttcg     1800
gtctcttgcc caggctggag tgcaatggcg tgatcttggg tctactgcagc ctccacctcc     1860
cgggttcaag tgattctcct gcctcagcct ctcaagtagc tgagccacca cacctggcta     1920
attttgattt tttggtagag aaggggtttc atcatgttgg tcaggctgat ctcgaactcc     1980
tgacctcagg tgatccacta atctcagcct cccaaagtgc tgggattaca gatgtgagcc     2040

```


ES 2 470 440 B1

actgtgcctg	gcctgataca	attaacttga	atgttatata	tgtgactttt	ttggtgtgtg	2100
taacacatta	ttacagtgga	tggagaagac	atcatctgga	ttatacatat	ttcgcaatga	2160
aagagaggaa	gaaaagggaag	cagcaaaaata	tgtggaggcc	caacaaaaga	gactagaagc	2220
cttattcact	aaaattcagg	aggaatttga	agaacatgaa	ggtaaaatta	gttatatggt	2280
acacattggt	atttctaata	tgagaacaaa	gtcttagaga	ctttgaattt	aacattttta	2340
atgagtaaat	tgtttttatt	ttgagtagta	aattgacttt	attttttagt	atctagggta	2400
ttcttttttg	gtgttagaca	aagaatagca	acaagggaca	gaaatatcag	gtctaagcca	2460
tttgtaatcc	ttctttgggt	gttttatgct	tggttcttta	gttttagttg	cttttgaatt	2520
tacagtttag	tgaattaata	atccttttgt	tttcttagaa	aacacaacaa	aaccatattt	2580
accatcacgt	gcactaacia	gacagcaagt	tcgtgctttg	caagatgggtg	cagagcttta	2640
tgaagcagtg	aagaatgcag	cagacccagc	ttaccttgag	gtgagagagt	aagaggacat	2700
ataatgaggc	ttgatgatta	ttcaagggtga	gaagctgttt	tagactctct	ggccatcaca	2760
ggaaggagta	tgttgaaatg	ctgcatttct	caaaagggat	gtgtacattt	ctgggatttt	2820
cagtgatgtg	ccagacgagt	gtggtggtat	gttttcaact	atataccgag	tagaggatgg	2880
gagggttcta	gaattttata	tattaattaa	atttggttta	aatgcaggc	aaaacttggt	2940
tttagccatc	tgtaatgtag	ttggtgatga	ttatgattat	tagagtacat	ttataattgg	3000
aggatcattt	ttgccgtagg	gaaatagaat	tattaatagt	ttgaggcacc	tgagaatatt	3060
atgtgagaaa	ctgattacat	taaccacacc	cttaagatga	gctctaattt	tgttgatttt	3120
gtcctgttta	aagccatcta	gttacaatag	atggaacttt	tttgttctga	ttgcttttta	3180
ttccaatatc	ttaaattggc	acagggttat	ttcagtgaag	agcagttaag	agccttgaat	3240
aatcacaggc	aaatgttgaa	tgataagaaa	caagctcaga	tccagttgga	aattaggaag	3300
gcatggaat	ctgctgaaca	aaaggaacaa	ggtttatcaa	gggatgtcac	aaccgtgtgg	3360
aagttgcgta	ttgtaagcta	ttcaaaaaaa	gaaaaagatt	caggtaagta	tgtaaatgct	3420
ttgtttttat	cagttttatt	aacttaaaaa	atgaccttac	taacaaaatg	attataaatc	3480
cagataaagt	ataaagttag	tttatatcag	agaagcaaaa	tccactacta	atgccacaaa	3540
agagataata	taaaagagga	tctgtattta	ttttgaaaca	aacatttaaa	tgataatcac	3600
ttcttccatt	gcatctttct	catctttctc	caaacagtta	tactgagtat	ttggcgtcca	3660
tcatcagatt	tatattctct	gttaacagaa	ggaaagagat	acagaattta	tcatcttgca	3720
acttcaaaat	ctaaaagtaa	atctgaaaga	gctaacatac	agttagcagc	gacaaaaaaa	3780
actcagtatc	aacaactacc	ggtacaaacc	tttcattgta	atttttcagt	tttgataagt	3840
gcttggttagt	ttatggaatc	tccatatggt	gaatttttgt	tttgttttct	gtaggtttca	3900
gatgaaattt	tatttcagat	ttaccagcca	cgggagcccc	ttcacttcag	caaattttta	3960
gatccagact	ttcagccatc	ttgttctgag	gtggacctaa	taggatttgt	cgtttctggt	4020
gtgaaaaaaa	caggtaatgc	acaatatagt	taattttttt	tattgattct	tttaaaaaac	4080
attgtctttt	aaaatctctt	atgattagtt	ggagctacca	gttggaat	ttgctagcta	4140

ES 2 470 440 B1

actagtgatc	tgaaagtaag	cctctttgaa	cctctgattt	aatctgtact	cctgttagca	4200
atgtgtgCGT	atacctgctt	ccacatgacc	tcagtaaaaag	aatgtgttgt	catattggta	4260
ttgaaatttt	agcactgtaa	gcaacaggtc	attttggaag	acctgagctt	tcgccaaatt	4320
cagctatttt	gatttgcttt	tattattagc	atataccaaa	ataaataggc	atattagagt	4380
ttccttttct	gcatcttaaa	attcatctaa	cacatctata	ataacattct	tttctttttt	4440
ttccattcta	ggacttgccc	ctttcgctta	tttgtcagac	gaatgttaca	atttactggc	4500
aataaagttt	tggatagacc	ttaatgagga	cattattaag	cctcatatgt	taattgctgc	4560
aagcaacctc	cagtggcgac	cagaatccaa	atcaggcctt	cttactttat	ttgctggaga	4620
tttttctgtg	ttttctgcta	gtccaaaaga	gggccacttt	caagagacat	tcaacaaaat	4680
gaaaaatact	gttgaggtaa	ggttactttt	cagcatcacc	acacattttg	gtatttttct	4740
attttgacag	tccagtatca	aggaaatagc	ttttatacaa	attggatagt	tgaggtagta	4800
tgtgaggtaa	agtttaaatca	tatatattaatt	gcccatgaac	ctcaggagat	gggggaatgg	4860
ggaaatgaca	gcaactagaa	agagaagaat	gacttgaagg	gaaatgagtt	aggagaaatt	4920
gtgagaagga	tgttcagaaa	tgcagacttt	gtaagcaaac	tggaaattgg	ttacaagaat	4980
aatatgagtt	atctgtgggt	tgcagcagtc	agcagtgtga	ttagttaata	atatagagac	5040
tacaggttta	catttaaact	ccatatctag	tgttttatac	agattatatt	tctttgactt	5100
gatttaatcc	cagataagag	acactgaggt	accagtaaat	agagctagga	cttgagcccc	5160
aatcttccag	cttcaatcca	gatcatatga	cagcttgctg	attaaactag	atgacagaga	5220
agatctcttt	ccttcagata	cacatacttt	ttctctgttc	ccctctccct	atcagctaga	5280
ttcccctaaa	tactgatac	tggttttgta	attttgcata	ggcatgtttg	acaattggta	5340
tcacatttag	ggtttttcat	tcttttttgg	tccaaacttt	tcatttctgc	ttttaaagga	5400
aatacttttg	gaaacataaa	tatgtggggt	tgcaatttat	aaagcagctt	ttccacttat	5460
tttcttagaa	tattgacata	ctttgcaatg	aagcagaaaa	caagcttatg	catatactgc	5520
atgcaaatga	tccaagtgg	tccaccccaa	ctaaagactg	tacttcaggg	ccgtacactg	5580
ctcaaatcat	tcctggtaca	ggaaacaagc	ttctggtaag	ttaatgtaaa	ctcaaggaat	5640
attataagaa	gtatatatgg	aggccatcgt	atattctgtt	gtatacctag	taaacatggt	5700
aaaatgtaat	taaacttaat	tagaaaatgt	ggttgttatg	tggctcctgt	aagtatagtt	5760
athtagaaat	tttattttatt	gaagcaagat	atgaaactct	gggtgcacac	tttccaaaca	5820
ggtgctttca	tttacctgtg	attgaaaagt	gttttttgtc	atttatttca	ctgttccata	5880
caattagggg	tgtttctaag	ctgtttgtaa	gctgtttcta	agctatttaa	gtggttaaat	5940
cacagtagat	gcaaatcaag	gtaccagct	tttgttcctt	tttgtgaggg	tcttccttcc	6000
ttttcatgtc	attttatatg	ttcttatgta	aaattacttt	catctagaat	aggaataatg	6060
tgaactgaaa	tcacctaacc	tattaggagt	taggggaggg	agactgtgtg	taatatttgc	6120
gtgcttaaat	attttcaatg	aaaagttact	ttgatttagt	tttttatgtt	actacataat	6180
tatgataggc	tacgttttca	tttttttatc	agatgtcttc	tcctaattgt	gagatatatt	6240
atcaaagtcc	tttatcactt	tgtatggcca	aaaggaagtc	tgtttccaca	cctgtctcag	6300

ES 2 470 440 B1

cccagatgac	ttcaaagtct	tgtaaagggg	agaaagagat	tgatgaccaa	aagaactgca	6360
aaaagagaag	agccttggat	ttcttgagta	gactgccttt	acctccacct	gttagtccca	6420
tttgtacatt	tgttttctccg	gctgcacaga	aggcatttca	gccaccaagg	agttgtggca	6480
ccaaatacga	aacacccata	aagaaaaaag	aactgaattc	tcctcagatg	actccattta	6540
aaaaattcaa	tgaaaatttct	cttttggaaa	gtaattcaat	agctgacgaa	gaacttgcat	6600
tgataaatac	ccaagctctt	ttgtctgggt	caacaggaga	aaaacaattt	atatctgtca	6660
gtgaatccac	taggactgct	cccaccagtt	cagaagatta	tctcagactg	aaacgacgtt	6720
gtactacatc	tctgatcaaa	gaacaggaga	gttcccaggc	cagtacggaa	gaatgtgaga	6780
aaaataagca	ggacacaatt	acaactaaaa	aatatatcta	agcatttgca	aaggcgacaa	6840
taaattattg	acgcttaacc	tttccagttt	ataagactgg	aatataattt	caaaccacac	6900
attagtactt	atgttgcaca	atgagaaaag	aaattaaggt	ggagagagag	acagagacag	6960
atccattcga	ccaattcact	cctcaggtgc	aggctgccta	tcagaagggtg	gtggctgggtg	7020
tggccaatgc	cctggctcac	aaataccact	gagatccaga	catgataaga	tacattgatg	7080
agtttggaca	aaccacaact	agaatgcagt	gaaaaaaatg	ctttatttgt	gaaatttgtg	7140
atgctattgc	tttatttcta	accattataa	gctgcaataa	acaagttaac	aacaacaatt	7200
gcattcattt	tatgtttcag	gttcagggggg	agggtgtggga	ggttttttta	agcaagtaaa	7260
acctctacaa	atgtgggtatg	gctgattatg	atccccagga	agctcctctg	tgtcctcata	7320
aaccctaacc	tcctctactt	gagaggacat	tccaatcata	ggctgcccac	ccaccctctg	7380
tgtcctcctg	ttaattaggt	cacttaacaa	aaaggaaatt	gggtaggggt	ttttcacaga	7440
ccgctttcta	agggttaattt	taaaatatct	gggaagtccc	ttccactgct	gtgttccaga	7500
agtgttggtg	aacagcccac	aatgtcaac	agcagaaaca	tacaagctgt	cagctttgca	7560
caagggccca	acaccctgct	catcaagaag	cactgtgggt	gctgtgtag	taatgtgcaa	7620
aacaggaggc	acattttccc	cacctgtgta	ggttccaaaa	tatctagtgt	tttcattttt	7680
acttgatca	ggaacccagc	actccactgg	ataagcatta	tccttatcca	aaacagcctt	7740
gtggtcagtg	ttcatctgct	gactgtcaac	tgtagcattt	tttgggggta	cagtttgagc	7800
aggatatttg	gtcctgtagt	ttgctaacac	accccagggtg	gcacttttcg	gggaaatgtg	7860
cgcggaaccc	ctattttgtt	attttttcta	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	7920
caataaccct	gataaatgct	tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	7980
ttccgtgtcg	cccttattcc	cttttttgcg	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	8040
gaaacgctgg	tgaaagtaaa	agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	8100
gaactggatc	tcaacagcgg	taagatcctt	gagagttttc	gccccgaaga	acgttttcca	8160
atgatgagca	cttttaaagt	tctgctatgt	ggcgcggtat	tatcccgtat	tgacgccggg	8220
caagagcaac	tcggctcgccg	catacactat	tctcagaatg	acttggttga	gtactcacca	8280
gtcacagaaa	agcatcttac	ggatggcatg	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	8340
accatgagtg	ataacactgc	ggccaactta	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaatgag	8400

ES 2 470 440 B1

ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg	8460
gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca	8520
acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta	8580
atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct	8640
ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca	8700
gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag	8760
gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat	8820
tggttaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt	8880
taattttaaaa ggatctagggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatccttaac	8940
gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag	9000
atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg	9060
tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca	9120
gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga	9180
actctgtagc accgcctaca tacctcgcctc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca	9240
gtggcgataa gtcgtgtctt accggggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc	9300
agcggtcggg ctgaacgggg gggtcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca	9360
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa	9420
aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc	9480
cagggggaaa cgcctggat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc	9540
gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg	9600
cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat	9660
cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca	9720
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca	9780
aaccgcctct ccccgcgcggt tggccgattc attaattgag	9820

```

<210> 9
<211> 7675
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..7675
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 25 y 26 y secuencias
      flanqueantes de los intrones 24, 25 y 26 del gen BRCA2 de Homo
      sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1265..3991
<223> /note="Exones 25 y 26 y secuencias flanqueantes de los intrones
      24, 25 y 26 del gen BRCA2"

<220>
<221> misc_feature

```

ES 2 470 440 B1

<222> join(1..1264,3992..7675)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..7675
<223> /note="Minigen MGBR2_EX25-26"

```

<400> 9
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttattttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggaccc agagggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag      600
tgagggctctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgaacc      720
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tatcagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc     1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc     1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt     1140
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata     1200
cgactcacta tagggcgaaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg     1260
atcctatacc tgcttcacac tgacctcagt aaaagaatgt gttgtcatat tgggtattgaa     1320
attttagcac tgtaagcaac aggtcatttt ggaaaacctg agctttcgcc aaattcagct     1380
attttgattt gcttttatta ttagcatata ccaaaataaa taggcatatt agagtttcct     1440
ttcttgcatc ttaaaattca tctaacacat ctataataac attcttttct tttttttcca     1500
ttctaggact tgcccctttc gtctatttgt cagacgaatg ttacaattta ctggcaataa     1560
agttttggat agaccttaat gaggacatta ttaagcctca tatgttaatt gctgcaagca     1620
acctccagtg gcgaccagaa tccaaatcag gccttcttac tttatttgct ggagattttt     1680
ctgtgttttc tgctagtcca aaagagggcc actttcaaga gacattcaac aaaatgaaaa     1740
atactgttga ggtaagggtta cttttcagca tcaccacaca ttttgggtatt tttctatttt     1800
gacagtccag tatcaaggaa atagctttta tacaaattgg atagttgagg tagtatgtga     1860

```

ES 2 470 440 B1

ggtaaagttt	aatcatatat	taattgcccc	tgaacctcag	gagatggggg	aatggggaaa	1920
tgacagcaac	tagaaagaga	agaatgactt	gaagggaaat	gagttaggag	aaattgtgag	1980
aaggatgttc	agaaatgcag	actttgtaag	caaactggaa	attgggttaca	agaataatat	2040
gagttatctg	tggtttgcag	cagtcagcag	tgtgattagt	taataatata	gagactacag	2100
gtttacattt	aaactccata	tctagtgttt	tatacagatt	atatttcttt	gacttgattt	2160
aatcccagat	aagagacact	gatattattt	tccctagatc	atgtatgcat	tttctgctta	2220
aatctatata	tacattatat	aatattagct	ggtgtttatt	gagtgtttac	tatgtgtcag	2280
accttgttct	aagcttctca	tttaattctc	ccacaacctt	atgaggtagg	gaactgtttt	2340
tctattttat	cagtgcagaaa	cagggttaaat	ggcttgccct	agggtcaaat	ccaagttagt	2400
aaaactagga	ttcatactta	ggccatcgaa	tgcagaacct	agactaggaa	ctgctatgca	2460
atgctgcctc	ccagtaaaat	ttgagatttc	atgagttggg	aactagttaa	gaatacacia	2520
aaaataagcc	tcttaattct	gtagttaaat	atttgaaatg	tgtgttattc	agaatttata	2580
taaaaatata	ttttaaaagc	attagagtag	ctgtataaag	aaagctgtgt	tgacatttta	2640
cctagagact	ctatgcataa	tgaataacac	tctgctatat	ctagtttcta	aattaggggt	2700
gggagttgta	ttcattattt	agttcccata	cagcatatct	actgtttaca	ccccacattt	2760
tctttttttc	tttctttctt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttagag	acagagtctt	2820
gctttgtcac	ccccaggctg	gagtacaata	gcacaatctc	ggatcactgc	agtgtctgcc	2880
tcctgggctc	aagcgattct	cgtgccttag	cctcccaagt	agctgggact	acaggtgcgt	2940
gccaccacgc	ccagctaatt	tttgtatttt	tagtagagac	atggtttcac	catgttgggc	3000
agtctgggtc	cgaactcttg	gcctcaagtg	atctgcccac	cttggcctcc	ccaagtactg	3060
ggtttacagg	catgagccac	cgagcccgca	ttttctctga	gacgtcttca	aaggcagttt	3120
actaatcctg	ctgaagagac	aactgtcatt	tacacagcat	tttaaagttt	tacaaaatac	3180
tgtcatgaat	taggttaaac	catatgaaat	tgctgatatt	tgaccagttg	tgatttctca	3240
agcaacagtt	tcatgtagtt	taacctataa	atcatttcaa	ttaattcttg	gaacagacgt	3300
gaggtaggtg	aggcaattct	ttcttttctc	taaccaaaga	agtaccttta	tagatgtgag	3360
atgattccca	gctattaagt	agtaaataga	gctaggactt	gagccccaat	cttcagctt	3420
caatccagat	catatgacag	cttgctgatt	aaactagatg	acagagaaga	tctctttcct	3480
tcagatacac	atactttttc	tctgttcccc	tctccctatc	agctagattc	ccctaaatca	3540
ctgatactgg	ttttgtaatt	ttgcatcggc	atgtttgaca	attgggtatca	catttagggg	3600
ttttcattct	tttttggtcc	aaactttttc	tttctgcttt	taaaggaaat	acttttgtaa	3660
acataaatat	gtgggtttgc	aatttataaa	gcagcttttc	cacttatttt	cttagaatat	3720
tgacatactt	tgcaatgaag	cagaaaacaa	gcttatgcat	atactgcatg	caaatgatcc	3780
caagtgggtc	accccaacta	aagactgtac	ttcagggccg	tacactgctc	aatcatttcc	3840
tggtacagga	aacaagcttc	tggttaagtta	atgtaaaactc	aagggaatatt	ataagaagta	3900
tatatggagg	ccatcgtata	ttctgttgta	tacctagtaa	acatggtaaa	atgtaattaa	3960
acttaattag	aaaatgtggg	tgttatgtgg	cctcgagggg	gggcccggta	cccagctttt	4020

ES 2 470 440 B1

gttccctttt	gtgaggggta	attgcgcgct	tggcgtaatc	atggtcatag	ctgtttcctg	4080
tgtgaaattg	ttatccgctc	acaattccac	acaacatacg	agccggaagc	ataaagtgtg	4140
aagcctgggg	tgcctaatag	gtgagctaac	tcacattaat	tgcgttgcg	tcactgcccc	4200
ccatatgata	cagaggtaca	taatgtttgg	gccacacatg	ccggtgtacc	cacagacccc	4260
aaccacacaag	aagtagtatt	ggtaaatgtg	acagaaaatt	ttaacatgtg	gaaaaatgac	4320
atggtagaac	agatgcatga	ggatataatc	agtttatggg	atcaaagcct	aaagccatgt	4380
gtaggaaaac	tactttgcac	cactgctgtg	ccttggaatg	ctagttggag	taataaatct	4440
ctggaacaga	tttggaatca	cacgacctgg	atggagtggg	acagagaaat	taacaattac	4500
acaaacttaa	tacactcctt	aattgaagaa	tcgcaaaacc	agcaagaaaa	gaatgaacaa	4560
gaattattgg	aattagataa	atgggcaagt	ttgtggaatt	ggtttaacat	aacaaattgg	4620
ctgtggtata	taaaattatt	cataatgata	gtaggaggct	tggtagggtt	aagaatagtt	4680
tttgctgtac	tttctgtagt	gaatagagtt	aggcagggat	attcaccatt	ttcttttcag	4740
gcctggagat	ctcccgaggg	gacccgacag	gcccgaagga	atagaagaag	aaggtggaga	4800
gagagacaga	gacagatcca	ttcgaccaat	tcactcctca	ggtgcaggct	gcctatcaga	4860
aggtggtggc	tggtgtggcc	aatgccctgg	ctcaciaata	ccactgagat	ccagacatga	4920
taagatacat	tgatgagttt	ggacaaacca	caactagaat	gcagtgaaaa	aatgcttta	4980
tttgtgaaat	ttgtgatgct	attgctttat	ttgtaaccat	tataagctgc	aataaacaag	5040
ttaacaacaa	caattgcatt	cattttatgt	ttcagggtca	gggggagggtg	tgggagggtt	5100
tttaaagcaa	gtaaaacctc	tacaaatgtg	gtatggctga	ttatgatccc	caggaagctc	5160
ctctgtgtcc	tcataaaccc	taacctcctc	tacttgagag	gacattccaa	tcataggctg	5220
cccatccacc	ctctgtgtcc	tcctgttaat	taggtcactt	aacaaaaagg	aaattgggta	5280
ggggtttttc	acagaccgct	ttctaagggt	aattttaaaa	tatctgggaa	gtcccttcca	5340
ctgctgtgtt	ccagaagtgt	tggtaaacag	cccacaaatg	tcaacagcag	aaacatacaa	5400
gctgtcagct	ttgcacaagg	gcccacacac	ctgctcatca	agaagcactg	tggttgctgt	5460
gtagtagaatg	tgcaaaacag	gaggcacatt	ttccccacct	gtgtaggttc	caaaatatct	5520
agtgttttca	tttttacttg	gatcaggaac	ccagcactcc	actggataag	cattatcctt	5580
atccaaaaca	gccttggtgt	cagtgttcat	ctgctgactg	tcaactgtag	catttttttg	5640
ggttacagtt	tgagcaggat	atttggtcct	gtagtttgct	aacacacccc	aggtggcact	5700
tttcggggaa	atgtgcgcg	aacccttatt	tgtttatatt	tctaaataca	ttcaaatatg	5760
tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	5820
atgagtattc	aacatttccg	tgtcgccctt	attccctttt	ttgcggcatt	ttgccttcct	5880
gtttttgctc	acccagaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	ctgaagatca	gttggttgca	5940
cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	agcggttaaga	tccttgagag	ttttcgcccc	6000
gaagaacggt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagtctctg	tatgtggcg	ggtattatcc	6060
cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggt	cgccgcatac	actattctca	gaatgacttg	6120

ES 2 470 440 B1

```

gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta 6180
tgcagtgctg ccataacccat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc 6240
ggaggaccga atgagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt 6300
gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaagc acgagcgtga caccacgatg 6360
cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct 6420
tccccgcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc 6480
tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct 6540
cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac 6600
acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gatagggtgcc 6660
tactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat 6720
ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg 6780
acaaaaatcc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgtg gaaaagatca 6840
aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa aaaaaaaaaac 6900
caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg 6960
taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag 7020
gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac 7080
cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt 7140
taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtt gtgcacacag cccagcttgg 7200
agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc 7260
ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggatc cggttaagcg cagggtcgga acaggagagc 7320
gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc 7380
acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa 7440
acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt 7500
tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg 7560
ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag 7620
agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcag 7675

```

```

<210> 10
<211> 6920
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..6920
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exon 10 y secuencias
      "
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1277..3236
<223> /note="Exon 10 y secuencias flanqueantes de los intrones 9 y 10

```


ES 2 470 440 B1

de1 gen BRCA2"

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1276,3237..6920)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..6920
<223> /note="Minigen MGBR2_EX10"

<400> 10
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggcctccca 120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta 180
actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt 360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480
ggttgtctac ccatggaccc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa 540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag 600
tgaggggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca 660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720
tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780
catagtaatc atagaatata ggaaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa taccagcact 900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgcat cgggtcgggc 1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 1140
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200
cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260
atcccccggg ctgcagacac aaaaacaaag cctattgaaa attttcagag acaataagat 1320
atataattaa caaaatctga gctttttttt ttctaattag aaagtaaagtg tggtttagat 1380
ataccatagt ttacctaatc aggtcatgga atattgcatt tttcttagta tgtgtgtatg 1440
tctgtataac tgtgtaggat ttgatatctg tttttgtctg tgtgggtatca tgtacgtatg 1500
tatatgcata tgtaaaatca gatttacctt tgttataggg ccacagaatt gatttggaac 1560
atctgttttg ataggcttta gaatatctaa ttgtatatat agtaagatta ggtgagtttt 1620
aattgtgtag aactgctaaa gaaagggttt tagggattgt tgtatgaata aaaggcttta 1680
ggttcattgg aatcagggga atcaggcttt actagaagaa caggagaagg ggtgactgac 1740

ES 2 470 440 B1

cgaaaaataa	aatgccaagt	actcagaata	accctttaaa	tactgatatg	taatatttag	1800
cacattctac	ataaactggt	tctatgagaa	agggtgtgag	aataatataa	attatatggc	1860
ttataaaata	ttaatgtgct	tctgttttat	actttaacag	gatttggaaa	aacatcaggg	1920
aattcattta	aagtaaatag	ctgcaaagac	cacattggaa	agtcaatgcc	aatgtccta	1980
gaagatgaag	tatatgaaac	agttgtagat	acctctgaag	aagatagttt	ttcattatgt	2040
ttttctaaat	gtagaacaaa	aaatctacaa	aaagtaagaa	ctagcaagac	taggaaaaaa	2100
attttccatg	aagcaaacgc	tgatgaatgt	gaaaaatcta	aaaaccaagt	gaaagaaaaa	2160
tactcatttg	tatctgaagt	ggaaccaaat	gatactgata	cattagattc	aatgttagca	2220
aatcagaagc	cctttgagag	tggaagtgtg	aaaatctcca	aggaagttgt	accgtctttg	2280
gcctgtgaat	gggtctcaact	aaccctttca	gggtctaaatg	gagcccagat	ggagaaaata	2340
cccctattgc	atattttctt	atgtgaccaa	aatattttcag	aaaaagacct	attagacaca	2400
gagaacaaaa	gaaagaaaga	ttttcttact	tcagagaatt	ctttgccacg	tatttctagc	2460
ctacaaaaat	cagagaagcc	attaaatgag	gaaacagtgg	taaataagag	agatgaagag	2520
cagcatcttg	aatctcatal	agactgcatt	cttgtagtaa	agcaggcaat	atctggaact	2580
tctccagtgg	cttcttcatt	tcagggtatc	aaaaagtcta	tattcagaat	aagagaatca	2640
cctaaagaga	ctttcaatgc	aagtttttca	gggtcatatga	ctgatccaaa	ctttaaaaaa	2700
gaaactgaag	cctctgaaag	tggaactggaa	atacatactg	tttgctcaca	gaaggaggac	2760
tccttatgtc	caaatttaata	tgataatgga	agctggccag	ccaccaccac	acagaattct	2820
gtagctttga	agaatgcagg	tttaatatcc	actttgaaaa	agaaaacaaa	taagtattat	2880
tatgctatac	atgatgaaac	atcttataaa	ggaaaaaaaa	taccgaaaga	ccaaaaatca	2940
gaactaatta	actgttcagc	ccagtttgaa	gcaaatgctt	ttgaagcacc	acttacattt	3000
gcaaatgctg	attcaggtac	ctctgtcttt	ttttttttgt	aaatagtaca	tatagtttta	3060
tagatgacga	ttccttctgt	gtttttttct	gctttttaaa	atcttcatat	cttatattta	3120
atcttaggca	tcactgttat	acatgattgt	ttaggtcttt	aattaccagt	gtttagaatc	3180
aggctactca	aacatggtag	ataagtttgc	atagtttgtg	tatatccatc	actcttctcg	3240
agggggggcc	cggtacccag	cttttgttcc	cttttgtagg	ggtaattgtc	gcgcttggcg	3300
taatcatggt	catagctgtt	tcctgtgtga	aattgttatc	cgctcacaat	tccacacaac	3360
atacgagccg	gaagcataaa	gtgtaaagcc	tggggtgcct	aatgagttag	ctaactcaca	3420
ttaattgcgt	tgcgctcact	gcccgccata	tgatacagag	gtacataatg	tttgggccac	3480
acatgccggg	gtacccacag	acccaaccc	acaagaagta	gtattggtaa	atgtgacaga	3540
aaattttaac	atgtggaaaa	atgacatggt	agaacagatg	catgaggata	taatcagttt	3600
atgggatcaa	agcctaaagc	catgtgtagg	aaaactactt	tgaccactg	ctgtgccttg	3660
gaatgctagt	tggaagtaata	aatctctgga	acagatttgg	aatcacacga	cctggatgga	3720
gtgggacaga	gaaattaaca	attacacaaa	cttaatacac	tccttaattg	aagaatcgca	3780
aaaccagcaa	gaaaagaatg	aacaagaatt	attggaatta	gataaatggg	caagtttgtg	3840
gaattgggtt	aacataacaa	attggctgtg	gtatataaaa	ttattcataa	tgatagtagg	3900

ES 2 470 440 B1

aggcttggtgta	ggtttaagaa	tagtttttgc	tgtactttct	gtagtgaata	gagttaggca	3960
gggatattca	ccatttttctt	ttcaggcctg	gagatctccc	gaggggaccc	gacaggccccg	4020
aaggaataga	agaagaaggt	ggagagagag	acagagacag	atccattcga	ccaattcact	4080
cctcagggtgc	aggctgccta	tcagaagggtg	gtggctgggtg	tggccaatgc	cctgggtcac	4140
aaataccact	gagatccaga	catgataaga	tacattgatg	agtttggaca	aaccacaact	4200
agaatgcagt	gaaaaaaatg	ctttatttgt	gaaatttgtg	atgctattgc	tttatttgta	4260
accattataa	gctgcaataa	acaagttaac	aacaacaatt	gcattcattt	tatgtttcag	4320
gttcaggggg	agggtgtggga	ggttttttaa	agcaagtaaa	acctctacaa	atgtgggtatg	4380
gctgattatg	atccccagga	agctcctctg	tgtcctcata	aaccctaacc	tcctctactt	4440
gagaggacat	tccaatcata	ggctgcccac	ccaccctctg	tgtcctcctg	ttaattaggt	4500
cacttaacaa	aaaggaaatt	gggtaggggt	ttttcacaga	ccgctttcta	agggtaat	4560
taaaatatct	gggaagtccc	ttccactgct	gtgttccaga	agtgttggtg	aacagcccac	4620
aaatgtcaac	agcagaaaca	tacaagctgt	cagctttgca	caagggccca	acaccctgct	4680
catcaagaag	cactgtgggt	gctgtgttag	taatgtgcaa	aacaggaggc	acattttccc	4740
cacctgtgta	ggttccaaaa	tatctagtgt	tttcattttt	acttgatca	ggaaccagc	4800
actccactgg	ataagcatta	tccttatcca	aaacagcctt	gtggtcagt	ttcatctgct	4860
gactgtcaac	tgtagcattt	tttgggggta	cagtttgagc	aggatatttg	gtcctgtagt	4920
ttgctaacac	accccagggtg	gcacttttcg	gggaaatgtg	cgcggaaccc	ctatttgttt	4980
atttttctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	5040
tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	5100
cttttttgcg	gcatttttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	5160
agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	5220
taagatcctt	gagagttttc	gccccgaaga	acgtttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	5280
tctgctatgt	ggcgcggtat	tatcccgtat	tgacgccggg	caagagcaac	tcggtcgccg	5340
catacactat	tctcagaatg	acttggttga	gtactacca	gtcacagaaa	agcatcttac	5400
ggatggcatg	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagt	ataaactgc	5460
ggccaactta	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaatgag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	5520
catgggggat	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	5580
aaacgacgag	cgtgacacca	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaactatt	5640
aactggcgaa	ctacttactc	tagcttcccc	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcgga	5700
taaagttgca	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	5760
atctggagcc	ggtgagcgtg	ggtctcgcgg	tatcattgca	gactggggc	cagatggtaa	5820
gccctcccgt	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	5880
tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggtaactgt	cagaccaagt	5940
ttactcatat	atactttaga	ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	6000

ES 2 470 440 B1

```

gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatccttaac gtgagttttc gttccactga      6060
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta      6120
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa      6180
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact      6240
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca      6300
tacctcgtc tgctaatcct gttaccagt gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt      6360
accgggttgg actcaagacg atagtaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg      6420
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag      6480
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcgacag gtatccggtg      6540
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat      6600
ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg      6660
tcagggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc      6720
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac      6780
cgtattaccg cttttgagt gctgataacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc      6840
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgcgt      6900
tggccgattc attaatgcag                                         6920

```

```

<210> 11
<211> 7294
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..7294
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 4, 5, 6 y 7 y
      secuencias flanqueantes de los intrones 3, 4, 5, 6 y 7 del gen
      BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1283..3610
<223> /note="Exones 4, 5, 6 y 7 y secuencias flanqueantes de los
      intrones 3, 4, 5, 6 y 7 del gen BRCA2"

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1282,3611..7294)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..7294
<223> /note="Minigen MGBR2_EX4-7"

```

```

<400> 11
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240

```

ES 2 470 440 B1

ctaatttttt	ttattttatgc	agaggccgag	gccgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	300
tagtgaggag	gcttttttgg	aggcctaggc	ttttgcaaaa	aacttggact	gtgtttactt	360
gcaatcccc	aaaacagaca	gaatggtgca	tctgtccagt	gaggagaagt	ctgcggtcac	420
tgccctgtgg	ggcaagggtga	atgtggaaga	agttggtggt	gaggccctgg	gcaggctgct	480
ggttgtctac	ccatggaccc	agagggttctt	cgagtccttt	ggggacctgt	cctctgcaaa	540
tgctgttatg	aacaatccta	aggtgaaggc	tcatggcaag	aagggtgctgg	ctgccttcag	600
tgagggctctg	agtcacctgg	acaacctcaa	aggcaccttt	gctaagctga	gtgaactgca	660
ctgtgacaag	ctgcacgctc	tagagtcgac	ccagcagtaa	gtaatacatg	taatgcaacc	720
tatacaaata	gcaatagtag	cattagtagt	agcaataata	atagcaatag	ttgtgtggtc	780
catagtaatc	atagaatata	ggaaaatatt	aagacaaaga	aaaatagaca	ggttaattga	840
tagactaata	gaaagagcag	aagacagtgg	caatgagagt	gaaggagaaa	tatcagcact	900
tgtggagatg	gggggtggaga	tggggcacca	tgctccttgg	gatgttgatg	atctgtagtg	960
ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atggggtagg	gatcaccaga	attgtaacgc	1020
ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	gaagggcgat	cgggtgcgggc	1080
ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	1140
aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	1200
cgactcacta	tagggcgaaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtgg	1260
atcccccggg	ctgcaggaat	tctctggtac	attggtaggt	tttcagtaaa	tgtcttcctt	1320
tactcctttt	ttctctttcc	ttctgctttt	gtttaaagcg	acaagatgtt	gctcttttcc	1380
caggctggaa	tacagtggca	tgatcatagc	tcaagctcct	gggctcaagt	gatcctcccg	1440
cctcagcctc	tcaagtagct	aggactacag	gcataatcacc	acaccagcgt	tttctttgta	1500
gaggcagagt	ctcactctgt	tgctcaggca	ggtgttgaac	tcctgcctca	agcaatcctc	1560
ccacctcagc	ctcccagagc	cctcaaatta	taagccactg	tgctcggggc	atcctttttg	1620
gggggtaatc	agcaaactga	aaaacctctt	cttacaactc	cctatacatt	ctcattccca	1680
gtatagagga	gactttttgt	ttttaaacac	ttccaaagaa	tgcaaattta	taatccagag	1740
tatatacatt	ctcactgaat	tattgtactg	tttcaggaag	gaatgttccc	aatagtagac	1800
ataaaagtct	tcgcacagtg	aaaactaaaa	tggatcaagc	agatgatgtt	tcctgtccac	1860
ttctaaattc	ttgtcttagt	gaaaggatat	atgaagctat	tatattaaaa	tatttaaattg	1920
aaacattttc	ctacatatat	ttgttctata	aagatgaatc	tgatttttat	gctaataattt	1980
tggctaagag	cctggtagaa	gatcttacat	ttttaataaa	tcttttaggt	tgagtccttt	2040
aatagaatag	tttttacatt	agaaacatgt	aagttgttgt	tcttgtgatg	ttgaattggc	2100
tggttttctg	tatattctgt	gattttttta	gtaacaaaaa	taacagtggg	gaaaagcagt	2160
aagtcagtcc	ttgaattatc	aatttaaaat	aaattgtgta	cttttcatct	ttggagagaa	2220
tatgattttac	tttacaaatt	ttttttttgt	tttttttttt	tttgagatgg	agtctctgtc	2280
acccaggctg	tagtgcagtg	gtgcgatctc	agctcactgc	aagctccgcc	tcccgggttc	2340

ES 2 470 440 B1

acgccattct	cctgcctcag	cctcccaagt	agctgggact	acaggcgccc	gccaccatgc	2400
ccggctaatt	ttttgtat	tttagtagaga	cgggggttca	ctgtgttagc	taggatggtc	2460
tcgatttcct	gacctcgtga	tccgcccgcc	tcagcctccc	agactgctgg	gattacaggc	2520
gtgaaccact	gtgcccggcc	tactttacaa	aatTTTTgag	tttaaaatac	acggtttcca	2580
gcagctgaaa	tttgtgagta	catatgtgtt	ggcattttaa	acatcacttg	atgattat	2640
aatgcttcat	gagagattta	ctttttaaaa	tgtaataata	aatatctaaa	agtagtattc	2700
caacaattta	tatgaatgag	aatcttcttt	taaaaataag	ataaactagt	ttttgccagt	2760
tttttaaaat	aacctaaggg	atttgctttg	ttttatttta	gtcctgttgt	tctacaatgt	2820
acacatgtaa	caccacaaag	agataagtca	ggtatgatta	aaaacaatgc	tttttattct	2880
tagaatacta	gaaatgttaa	taaaaataaa	acttaacaat	tttccccctt	ttttaccccc	2940
agtggtatgt	gggagtttgt	ttcatacacc	aaagtttgtg	aaggtaaata	ttctacctgg	3000
tttattttta	tgacttagta	attgagaatt	tgacaatagc	gttatacctt	tgccctgaga	3060
tttacaaatc	tgtacctagc	attctgcctc	atacaggcaa	ttcagtaaac	gttaagtga	3120
ataaagagtg	aatgaaaaaa	taatatcctt	aatgatcagg	gcatttctat	aaaaaataaa	3180
ctattttctt	tcctcccagg	gtcgtcagac	acaaaacat	atttctgaaa	gtctaggagc	3240
tgagggtgat	cctgatatgt	cttgggtcaag	ttcttttagct	acaccacca	cccttagttc	3300
tactgtgctc	ataggtaata	atagcaaatg	tgtattttaca	agaaagagca	gatgaggttg	3360
ataattgtca	tctctaatac	ttctgttaaa	aggaaatatg	aaaagaaaat	attagataat	3420
gtctttgata	agtgtgttag	taactgacaa	taattttatt	ctattaagtg	tagattggaa	3480
taaatacaaa	tacatttagt	ggtagtccag	tggtgtcaag	cattatgttt	tagtacgatg	3540
tgattaacgt	agaatagctt	acaaatattc	ctttactggc	ctatataagc	gtttaagagg	3600
cagtattttg	ctcgaggggg	ggcccgggtac	ccagcttttg	ttcccttttg	tgaggggttaa	3660
ttgcgcgctt	ggcgtaataca	tggtcatagc	tgtttcctgt	gtgaaattgt	tatccgctca	3720
caattccaca	caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	agcctggggg	gcctaattgag	3780
tgagctaact	cacattaatt	gcgttgcgct	cactgcccgc	catatgatac	agagggtacat	3840
aatgtttggg	ccacacatgc	cggtgtaccc	acagacccca	accacaaga	agtagtattg	3900
gtaaatgtga	cagaaaattt	taacatgtgg	aaaaatgaca	tggtagaaca	gatgcatgag	3960
gatataatca	gtttatggga	tcaaagccta	aagccatgtg	taggaaaact	actttgcacc	4020
actgctgtgc	cttggaatgc	tagttggagt	aataaatctc	tggaacagat	ttggaatcac	4080
acgacctgga	tggagtggga	cagagaaatt	aacaattaca	caaacttaat	acactcctta	4140
attgaagaat	cgcaaaaacca	gcaagaaaag	aatgaacaag	aattattgga	attagataaa	4200
tgggcaagtt	tgtggaattg	gtttaacata	acaaattggc	tgtggtatat	aaaattattc	4260
ataatgatag	taggagggtt	ggtagggtta	agaatagttt	ttgctgtact	ttctgtagtg	4320
aatagagtta	ggcaggggata	ttcaccattt	tcttttcagg	cctggagatc	tcccaggggg	4380
acccgacagg	cccgaaggaa	tagaagaaga	aggtggagag	agagacagag	acagatccat	4440
tcgaccaatt	cactcctcag	gtgcaggctg	cctatcagaa	ggtggtggct	ggtgtggcca	4500

ES 2 470 440 B1

atgccctggc	tcacaaatac	cactgagatc	cagacatgat	aagatacatt	gatgagtttg	4560
gacaaaccac	aactagaatg	cagtgaaaaa	aatgctttat	ttgtgaaatt	tgtgatgcta	4620
ttgctttatt	tgtaaccatt	ataagctgca	ataaacaagt	taacaacaac	aattgcattc	4680
atTTTTatg	tcaggttcag	ggggagggtg	gggagggttt	ttaaagcaag	taaaacctct	4740
acaaatgtgg	tatggctgat	tatgatcccc	aggaagctcc	tctgtgtcct	cataaacctt	4800
aacctcctct	acttgagagg	acattccaat	cataggctgc	ccatccaccc	tctgtgtcct	4860
cctgttaatt	aggtcactta	acaaaaagga	aattgggtag	gggtttttca	cagaccgctt	4920
tctaagggta	atTTTTaaat	atctgggaag	tcccttccac	tgctgtgttc	cagaagtgtt	4980
ggtaaacagc	ccacaaatgt	caacagcaga	aacatacaag	ctgtcagctt	tgcacaaggg	5040
cccaacaccc	tgctcatcaa	gaagcactgt	ggttgctgtg	ttagtaatgt	gcaaacaggg	5100
aggcacattt	ttcccacctg	tgtagggtcc	aaaatatcta	gtgttttcat	ttttacttgg	5160
atcaggaacc	cagcactcca	ctggataagc	attatcctta	tccaaaacag	ccttgtggtc	5220
agtgttcatt	tgctgactgt	caactgtagc	atTTTTtggg	gttacagtgt	gagcaggata	5280
tttggtcctg	tagtttgcta	acacacccca	ggtggcactt	ttcggggaaa	tgtgcgcgga	5340
accctatatt	gtttatTTTT	ctaaatacat	tcaaatatgt	atccgctcat	gagacaataa	5400
ccctgataaa	tgcttcaata	atattgaaaa	aggaagagta	tgagtattca	acatttccgt	5460
gtcgccctta	ttccctTTTT	tgcggcattt	tgccttcctg	tttttgctca	cccagaaacg	5520
ctggtgaaag	taaaagatgc	tgaagatcag	ttgggtgcac	gagtgggtta	catcgaactg	5580
gatctcaaca	gcggttaagat	ccttgagagt	tttcgccccg	aagaacgttt	tccaatgatg	5640
agcactttta	aagtctctgct	atgtggcgcg	gtattatccc	gtattgacgc	cgggcaagag	5700
caactcggtc	gccgcataca	ctattctcag	aatgacttgg	ttgagtactc	accagtcaca	5760
gaaaagcatc	ttacggatgg	catgacagta	agagaattat	gcagtgtctg	cataaccatg	5820
agtgataaca	ctgcggccaa	cttacttctg	acaacgatcg	gaggaccgaa	tgagctaacc	5880
gctTTTTtgc	acaacatggg	ggatcatgta	actcgccttg	atcgttggga	accggagctg	5940
aatgaagcca	taccaaacga	cgagcgtgac	accacgatgc	ctgtagcaat	ggcaacaacg	6000
ttgcgcaaac	tattaactgg	cgaactactt	actctagctt	cccggcaaca	attaatagac	6060
tggatggagg	cggataaaagt	tgcaaggacca	cttctgcgct	cggcccttcc	ggctggctgg	6120
tttattgctg	ataaatctgg	agccggtgag	cgtgggtctc	gcggtatcat	tgcagcactg	6180
gggccagatg	gtaagccctc	ccgtatcgta	gttatctaca	cgacggggag	tcaggcaact	6240
atggatgaac	gaaatagaca	gatcgctgag	ataggtgcct	cactgattaa	gcattggtaa	6300
ctgtcagacc	aagtttactc	atatatactt	tagattgatt	taaaacttca	tttttaattt	6360
aaaaggatct	aggatgaagat	cctttttgat	aatctcatga	ccaaaatcct	taacgtgagt	6420
tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	aggatcttct	tgagatcctt	6480
tttttctgcg	cgtaaatctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaacc	accgctacca	gcggtggttt	6540
gtttgccgga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaaggt	aactggcttc	agcagagcgc	6600

ES 2 470 440 B1

```

agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg      6660
tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg      6720
ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggt      6780
cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac      6840
tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg      6900
acaggatatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cagaggggag cttccagggg      6960
gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat      7020
ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt      7080
tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatggt ctttcctgcg ttatcccctg      7140
attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa      7200
cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc      7260
ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcag                                     7294

```

```

<210> 12
<211> 8061
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..8061
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 3, 4, 5, 6 y 7 y
      secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del
      gen BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1283..4377
<223> /note="Exones 3, 4, 5, 6 y 7 y secuencias flanqueantes de los
      intrones 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del gen BRCA2"

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1282,4378..8061)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..8061
<223> /note="Minigen MGBR2_EX3-7"

```

```

<400> 12
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccgccctt aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gctttttttg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtg atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480

```


ES 2 470 440 B1

ggttggtctac	ccatggacccc	agaggttctt	cgagtccttt	ggggacctgt	cctctgcaaa	540
tgctgttatg	aacaatccta	aggtgaaggc	tcatggcaag	aaggtgctgg	ctgccttcag	600
tgaggggtctg	agtcacctgg	acaacctcaa	aggcaccttt	gctaagctga	gtgaactgca	660
ctgtgacaag	ctgcacgctc	tagagtcgac	ccagcagtaa	gtaatacatg	taatgcaacc	720
tatacaaata	gcaatagtag	cattagtagt	agcaataata	atagcaatag	ttgtgtggtc	780
catagtaatc	atagaatata	ggaaaatatt	aagacaaaga	aaaatagaca	ggttaattga	840
tagactaata	gaaagagcag	aagacagtgg	caatgagagt	gaaggagaaa	tatcagcact	900
tgtggagatg	gggggtggaga	tggggcacca	tgctccttgg	gatgttgatg	atctgtagtg	960
ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atggggtagg	gatcaccaga	attgtaacgc	1020
ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	gaagggcgat	cgggtgcgggc	1080
ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	1140
aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	1200
cgactcacta	tagggcgaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtgg	1260
atcccccggg	ctgcaggaat	tccacacatc	cggacacaca	ttcgaagcca	tcttgtaact	1320
tttgtagaact	cttgttacac	ctttctatag	attcgcaaga	gaatggatta	atgatcttgt	1380
ttaattaata	tgccttaaca	aaagtaatcc	atagtcaaga	tcttaagcat	tttttctctt	1440
atgatcttta	actgttcttg	gtcacaaaatt	tgtctgtcac	tggttaaaac	taaggtggga	1500
tttttttttt	aaatagattt	aggaccaata	agtcttaatt	ggtttgaaga	actttcttca	1560
gaagctccac	cctataattc	tgaacctgca	gaagaatctg	aacataaaaa	caacaattac	1620
gaaccaaacc	tattttaaacc	tccacaaaagg	aaaccatctt	ataatcagct	ggcttcaact	1680
ccaataatat	tcaaagagca	agggctgact	ctgccgctgt	accaatctcc	tgtaaaagaa	1740
ttagataaat	tcaaattaga	cttaggtaag	taatgcaata	tggtagactg	gggagaacta	1800
caaactagga	atttaggcaa	acctgtgtta	aatcttagc	tcattcatta	attgtgtcat	1860
gctggggcaaa	tcagtctctc	tggcctcttt	ttcctcactc	gaaaaatgga	gacgatgaaa	1920
ataatgtctc	ataggttttg	attaaattaa	ataatgtagg	tacttagtaa	atgttctctt	1980
tcatccctcc	tttgataaat	ttgccaaactg	agatttgctg	aattacgtct	ttcttatgcc	2040
aagaattcct	ctggtacatt	ggtaggtttt	cagtaaattgt	cttcccttac	tccttttttc	2100
tctttccttc	tgctttttgtt	taaagcgaca	agatgttgct	cttttcccag	gctggaatac	2160
agtggcatga	tcatagctca	agctcctggg	ctcaagtgat	cctcccgctt	cagcctctca	2220
agtagctagg	actacaggca	tatcaccaca	ccagcgtttt	ctttgtagag	gcagagtctc	2280
actctgttgc	tcaggcaggt	gttgaactcc	tgccctcaagc	aatcctccca	cctcagcctc	2340
ccagagccct	caaattataa	gccactgtgc	tcggggcatc	ctttttgggg	ggtaatcagc	2400
aaactgaaaa	acctcttctt	acaactccct	atacattctc	attcccagta	tagaggagac	2460
tttttgtttt	taaacacttc	caaagaatgc	aaatttataa	tccagagtat	atacattctc	2520
actgaattat	tgtactgttt	caggaaggaa	tgttcccaat	agtagacata	aaagtcttcg	2580

ES 2 470 440 B1

cacagtgaaa	actaaaatgg	atcaagcaga	tgatgtttcc	tgtccacttc	taaattcctg	2640
tcttagtgaa	aggtagtgatg	aagctattat	attaaaaatat	ttaaatagaaa	cattttccta	2700
catatatattg	ttctataaaag	atgaatctga	tttttatgct	aatattttg	ctaagagcct	2760
ggtagaagat	cttacatttt	taaaataatct	tttaggttga	gtcctttaat	agaatagttt	2820
ttacattaga	aacatgtaag	ttgttgttct	tgtgatgttg	aattggctgg	ttttctgtat	2880
attctgtgat	tttttaagta	acaaaaataa	cagtggtgaa	aagcagtaag	tcagtccttg	2940
aattatcaat	ttaaaaataaa	ttgtgtactt	ttcatctttg	gagagaatat	gattttacttt	3000
acaaattttt	tttttgtttt	tttttttttt	gagatggagt	ctctgtcacc	caggctgtag	3060
tgcagtgggtg	cgatctcagc	tcactgcaag	ctccgcctcc	cgggttcacg	ccattctcct	3120
gcctcagcct	cccaagtagc	tgggactaca	ggcgcccgcc	accatgccc	gctaattttt	3180
tgtattttta	gtagagacgg	ggtttcactg	tgtagctag	gatggctctg	atttcctgac	3240
ctcgtgatcc	gccccgctca	gcctcccaga	ctgctgggat	tacaggcgtg	aaccactgtg	3300
cccggcctac	tttacaaaat	ttttgagttt	aaaatacacg	gtttccagca	gctgaaattt	3360
gtgagtacat	atgtgttggc	attttaaaaca	tcacttgatg	attatttaat	gcttcatgag	3420
agattttactt	tttaaaatgt	aatataaaaat	atctaaaagt	agtattccaa	caatttatat	3480
gaatgagaat	cttcttttaa	aaataagata	aactagtttt	tgccagtttt	ttaaaataac	3540
ctaagggatt	tgctttgttt	tatttttagtc	ctgttggtct	acaatgtaca	catgtaacac	3600
cacaaagaga	taagtcaggt	atgattaaaa	acaatgcttt	ttattcttag	aatactagaa	3660
atgttaataa	aaataaaaact	taacaatttt	cccctttttt	tacccccagt	ggtagtgagg	3720
agtttgtttc	atacaccaaa	gtttgtgaag	gtaaatattc	tacctggttt	atttttatga	3780
cttagtaatt	gagaatttga	caatagcgtt	atacctttgc	cctgagattt	acaaatctgt	3840
acctagcatt	ctgcctcata	caggcaattc	agtaaacggt	aagtgaataa	aagagtgaat	3900
gaaaaaataa	tatccttaat	gatcagggca	tttctataaa	aaataaacta	ttttctttcc	3960
tcccagggtc	gtcagacacc	aaaacatatt	tctgaaagtc	taggagctga	ggtaggtcct	4020
gatatgtctt	gggtcaagttc	tttagctaca	ccaccacccc	ttagttctac	tgtgctcata	4080
ggtaataata	gcaaatgtgt	atttacaaga	aagagcagat	gaggttgata	attgtcatct	4140
ctaatacttc	tgttaaaagg	aaatatgaaa	agaaaatatt	agataatgtc	tttgataagt	4200
gtgttagtaa	ctgacaataa	ttttattcta	ttaagtgtag	attggaataa	atacaaatac	4260
atttagtggt	agtccagtg	tgtcaagcat	tatgttttag	tacgatgtga	ttaacgtaga	4320
atagcttaca	aatattcctt	tactggccta	tataagcgtt	taagaggcag	tatttggtc	4380
gagggggggc	ccggtaccca	gcttttggtc	ccttttggtga	gggttaattg	cgcgcttggc	4440
gtaatcatgg	tcatagctgt	ttcctgtgtg	aaattgttat	ccgctcacia	ttccacacia	4500
catacgagcc	ggaagcataa	agtgtaaagc	ctgggggtgcc	taatgagtga	gctaactcac	4560
attaattgcg	ttgcgctcac	tgcccggcat	atgatacaga	ggtacataat	gtttgggcca	4620
cacatgccgg	tgtaccacaa	gaccccaacc	cacaagaagt	agtattggta	aatgtgacag	4680
aaaattttta	catgtggaaa	aatgacatgg	tagaacagat	gcatgaggat	ataatcagtt	4740

ES 2 470 440 B1

tatgggatca	aagcctaaag	ccatgtgtag	gaaaactact	ttgcaccact	gctgtgcctt	4800
ggaatgctag	ttggagtaat	aaatctctgg	aacagatttg	gaatcacacg	acctggatgg	4860
agtgggacag	agaaattaac	aattacacaa	acttaataca	ctccttaatt	gaagaatcgc	4920
aaaaccagca	agaaaagaat	gaacaagaat	tattggaatt	agataaatgg	gcaagtttgt	4980
ggaattgggt	taacataaca	aattggctgt	ggtatataaa	attattcata	atgatagtag	5040
gaggcttggt	aggtttaaga	atagtttttg	ctgtactttc	tgtagtgaat	agagttaggc	5100
agggatattc	accattttct	tttcaggcct	ggagatctcc	cgaggggacc	cgacaggccc	5160
gaaggaatag	aagaagaagg	tggagagaga	gacagagaca	gatccattcg	accaattcac	5220
tcctcagggt	caggctgcct	atcagaaggt	ggtggctggg	gtggccaatg	ccctggctca	5280
caaataccac	tgagatccag	acatgataag	atacattgat	gagtttgac	aaaccacaac	5340
tagaatgcag	tgaaaaaaat	gctttatttg	tgaaatttgt	gatgctattg	ctttatttgt	5400
aaccattata	agctgcaata	aacaagttaa	caacaacaat	tgcattcatt	ttatgtttca	5460
ggttcagggg	gaggtgtggg	aggtttttta	aagcaagtaa	aacctctaca	aatgtgggtat	5520
ggctgattat	gatccccagg	aagctcctct	gtgtcctcat	aaaccctaac	ctcctctact	5580
tgagaggaca	ttccaatcat	aggctgcca	tccaccctct	gtgtcctcct	gttaattagg	5640
tcacttaaca	aaaaggaaaat	tgggtagggg	tttttcacag	accgctttct	aagggttaatt	5700
ttaaaatata	tgggaagtcc	cttccactgc	tgtgttccag	aagtgttggt	aaacagccca	5760
caaatgtcaa	cagcagaaac	atacaagctg	tcagctttgc	acaaggggcc	aacaccctgc	5820
tcatcaagaa	gcactgtggg	tgctgtgtta	gtaatgtgca	aaacaggagg	cacattttcc	5880
ccacctgtgt	aggttccaaa	atatctagtg	ttttcatttt	tacttgatc	aggaaccag	5940
cactccactg	gataagcatt	atccttatcc	aaaacagcct	tgtggtcagt	gttcatctgc	6000
tgactgtcaa	ctgtagcatt	ttttgggggt	acagtttgag	caggatattt	ggtcctgtag	6060
tttgctaaca	caccccagggt	ggcacttttc	ggggaaatgt	gcgcggaacc	cctatttggt	6120
tatttttcta	aatacattca	aatatgtatc	cgctcatgag	acaataaacc	tgataaatgc	6180
ttcaataata	ttgaaaaagg	aagagtatga	gtattcaaca	tttccgtgtc	gcccttattc	6240
ccttttttgc	ggcattttgc	cttcctgttt	ttgctcacc	agaaacgctg	gtgaaagtaa	6300
aagatgctga	agatcagttg	ggtgcacgag	tgggttacat	cgaactggat	ctcaacagcg	6360
gtaagatcct	tgagagtttt	cgccccgaag	aacgttttcc	aatgatgagc	acttttaaag	6420
ttctgctatg	tggcgcggta	ttatcccgtg	ttgacgccgg	gcaagagcaa	ctcggtcgcc	6480
gcatacacta	ttctcagaat	gacttggttg	agtactcacc	agtcacagaa	aagcatctta	6540
cggatggcat	gacagtaaga	gaattatgca	gtgctgccat	aaccatgagt	gataaactg	6600
cggccaactt	acttctgaca	acgatcggag	gaccgaatga	gctaaccgct	tttttgcaca	6660
acatggggga	tcagttaact	cgccttgatc	gttggaacc	ggagctgaat	gaagccatac	6720
caaacgacga	gcgtgacacc	acgatgcctg	tagcaatggc	aacaacgttg	cgcaaactat	6780
taactggcga	actacttact	ctagcttccc	ggcaacaatt	aatagactgg	atggaggcgg	6840

ES 2 470 440 B1

```

ataaagtgtgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata      6900
aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg ccagatggta      6960
agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtcg ggcaactatg gatgaacgaa      7020
atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag      7080
tttactcata tatacttttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg      7140
tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccttaa cgtgagtttt cgttccactg      7200
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt      7260
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca      7320
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac      7380
tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac      7440
atacctcgct ctgctaatacc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct      7500
taccggggtg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg      7560
gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatactaca      7620
gcgtgagcta tgagaaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggg      7680
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta      7740
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc      7800
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc      7860
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa      7920
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag      7980
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg      8040
ttggccgatt cattaatgca g                                     8061

```

```

<210> 13
<211> 8600
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..8600
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 3, 4, 5, 6, 7 y 8 y
      secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 del
      gen BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1282,4932..8600)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 1283..4931
<223> /note="Exones 3, 4, 5, 6, 7 y 8 y secuencias flanqueantes de los
      intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 del gen BRCA2"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..8600

```

ES 2 470 440 B1

<223> /note="Minigen MGBR2_EX3-8"

<400> 13

ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt	60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggcctccca	120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta	180
actccgcccc tcccggcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga	240
ctaatttttt ttattttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag	300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt	360
gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac	420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct	480
ggttgtctac ccatggaccc agaggttctt cgagtcctt ggggacctgt cctctgcaaa	540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcattggcaag aagggtgctgg ctgccttcag	600
tgagggctctg agtcacctgg acaacctcaa aggcacctt gctaagctga gtgaactgca	660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc	720
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc	780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga	840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tatcagcact	900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg	960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc	1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc	1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt	1140
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata	1200
cgactcacta tagggcgaaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg	1260
atccccggg ctgcaggaat tccacacatc cggacacaca ttcgaagcca tcttgtaact	1320
tttgtaact cttgttacac ctttctatag attcgcaaga gaatggatta atgatcttgt	1380
ttaattaata tgccttaaca aaagtaatcc atagtcaaga tcttaagcat ttttttctt	1440
atgatcttta actgttctgg gtcacaaatt tgtctgtcac tggttaaaac taaggtggga	1500
ttttttttt aaatagattt aggaccaata agtcttaatt ggtttgaaga actttcttca	1560
gaagctccac cctataattc tgaacctgca gaagaatctg aacataaaaa caacaattac	1620
gaaccaaacc tattttaaacc tccacaaagg aaaccatctt ataatcagct ggcttcaact	1680
ccaataatat tcaaagagca agggctgact ctgccgctgt accaatctcc tgtaaaagaa	1740
ttagataaat tcaaattaga cttaggtaag taatgcaata tggtagactg gggagaacta	1800
caaactagga atttaggcaa acctgtgtta aaatcttagc tcattcatta attgtgtcat	1860
gctgggcaaa tcagtctctc tggcctctt ttcctcactc gaaaaatgga gacgatgaaa	1920
ataatgtctc ataggtttgg attaaattaa ataatgtagg tacttagtaa atgttctctt	1980
tcatccctcc ttgataaat ttgccaaact agatttgctg aattacgtct ttcttatgcc	2040

ES 2 470 440 B1

aagaattcct	ctggtacatt	ggtaggtttt	cagtaaagt	cttcccttac	tccttttttc	2100
tctttccttc	tgcttttggt	taaagcgaca	agatgttgct	cttttcccag	gctggaatac	2160
agtggcatga	tcatagtctca	agctcctggg	ctcaagtgat	cctcccgctt	cagcctctca	2220
agtagctagg	actacaggca	tatcaccaca	ccagcgtttt	ctttgtagag	gcagagtctc	2280
actctgttgc	tcaggcaggt	gttgaactcc	tgctcaagc	aatcctccca	cctcagcctc	2340
ccagagccct	caaattataa	gccactgtgc	tcggggcatc	ctttttgggg	ggtaatcagc	2400
aaactgaaaa	acctcttctt	acaactccct	atacattctc	attcccagta	tagaggagac	2460
tttttgtttt	taaacacttc	caaagaatgc	aaatttataa	tccagagtat	atacattctc	2520
actgaattat	tgtactgttt	caggaaggaa	tgttcccaat	agtagacata	aaagtcttcg	2580
cacagtgaaa	actaaaatgg	atcaagcaga	tgatgtttcc	tgtccacttc	taaattcttg	2640
tcttagtgaa	aggtagtgat	aagctattat	attaaaatat	ttaaatgaaa	cattttccta	2700
catatatattg	ttctataaaag	atgaatctga	tttttatgct	aatatttttg	ctaagagcct	2760
ggtagaagat	cttacatttt	taaataatct	tttaggttga	gtcctttaat	agaatagttt	2820
ttacattaga	aacatgtaag	ttgttggtct	tgtgatgttg	aattggctgg	ttttctgtat	2880
attctgtgat	tttttaagta	acaaaaataa	cagtggtgaa	aagcagtaag	tcagtccttg	2940
aattatcaat	ttaaaataaa	ttgtgtactt	ttcatctttg	gagagaatat	gatttacttt	3000
acaaattttt	tttttgtttt	tttttttttt	gagatggagt	ctctgtcacc	caggctgtag	3060
tgtagtggtg	cgatctcagc	tcactgcaag	ctccgcctcc	cgggttcacg	ccattctcct	3120
gcctcagcct	cccaagtagc	tgggactaca	ggcgcccgcc	accatgcccg	gctaattttt	3180
tgtattttta	gtagagacgg	ggtttcactg	tgtagctag	gatggctctg	atttcctgac	3240
ctcgtgatcc	gcccgcctca	gcctcccaga	ctgctgggat	tacaggcgtg	aaccactgtg	3300
cccggcctac	tttacaaaat	ttttgagttt	aaaatacacg	gtttccagca	gctgaaattt	3360
gtgagtacat	atgtgttggc	attttaaaaca	tcacttgatg	attatttaat	gcttcatgag	3420
agatttactt	tttaaaatgt	aatataaaat	atctaaaagt	agtattccaa	caatttatat	3480
gaatgagaat	cttcttttaa	aaataagata	aactagtttt	tgccagtttt	ttaaaataac	3540
ctaagggatt	tgctttgttt	tatttttagtc	ctgttggtct	acaatgtaca	catgtaacac	3600
cacaaagaga	taagtcaggt	atgattaaaa	acaatgcttt	ttattcttag	aatactagaa	3660
atgttaataa	aaataaaact	taacaatttt	cccctttttt	tacccccagt	ggtagtgagg	3720
agtttgtttc	atacaccaaa	gtttgtgaag	gtaaatattc	tacctggttt	atttttatga	3780
cttagtaatt	gagaatttga	caatagcggt	atacctttgc	cctgagattt	acaaatctgt	3840
acctagcatt	ctgcctcata	caggcaattc	agtaaacggt	aagtgaaata	aagagtgaat	3900
gaaaaaataa	tatccttaat	gatcagggca	tttctataaa	aaataaacta	ttttctttcc	3960
tcccagggtc	gtcagacacc	aaaacatatt	tctgaaagtc	taggagctga	ggtaggacct	4020
gatattgtctt	ggcaagttc	tttagctaca	ccaccaccc	ttagttctac	tgtgctcata	4080
ggtaataata	gcaaagtgtg	atttacaaga	aagagcagat	gaggttgata	attgtcatct	4140
ctaatacttc	tggttaaaagg	aaatatgaaa	agaaaatatt	agataatgtc	tttgataagt	4200

ES 2 470 440 B1

gtgttagtaa	ctgacaataa	ttttattcta	ttaagtgtag	attggaataa	atacaaatac	4260
athtagtggt	agtccagtg	tgcaagcat	tatgttttag	tacgatgtga	ttaacgtaga	4320
atagcttaca	aatattcctt	tactggccta	tataagcggt	taagaggcag	tatttggtc	4380
gaggtcataa	cctcacagca	tcattctgact	ttccaactca	ttgtggacag	tattaccata	4440
aagtaatgat	caccaagcca	tattcttacca	ccttgtgagt	agtactaagg	aagtaagtat	4500
agttttattca	ctgtgttgat	tgacctttct	aattactata	cttaagtact	tgaatcaatt	4560
cattttgttt	caaagtgtgc	atgtaatcaa	atagtagatg	tgctttttga	tgtctgacaa	4620
aaaataagtt	tttgcatctt	agtataata	tacaatacac	ataaattttt	atcttacagt	4680
cagaaatgaa	gaagcatctg	aaactgtatt	tcctcatgat	actactgctg	taagtaaata	4740
tgacattgat	tagactgttg	aaattgctaa	caattttgga	atgccttggt	aaattattta	4800
tcttacattt	ttaatttcct	aatctgtaat	ttatctaagc	cttgagaaa	gtctctaaac	4860
ctggtcctat	atgtgatttt	aacttcctgt	gaaactctgc	tgtctctctg	ttaaagttga	4920
agctttgtgt	gggtacccag	cttttggtcc	cttttgtag	ggtaattgc	gctgtggcg	4980
taatcatggt	catagctgtt	tcctgtgtga	aattgttatc	cgctcacaat	tccacacaac	5040
atacgagccg	gaagcataaa	gtgtaaagcc	tgggggtgcct	aatgagtgag	ctaactcaca	5100
ttaattgcgt	tgctgtcact	gcccgcata	tgatacagag	gtacataatg	tttgggccac	5160
acatgccggt	gtacccacag	acccaaccc	acaagaagta	gtattggtaa	atgtgacaga	5220
aaattttaac	atgtggaaaa	atgacatggt	agaacagatg	catgaggata	taatcagttt	5280
atgggatcaa	agcctaaagc	catgtgtagg	aaaactactt	tgcaccactg	ctgtgccttg	5340
gaatgctagt	tggagtaata	aatctctgga	acagatttg	aatcacacga	cctggatgga	5400
gtgggacaga	gaaattaaca	attacacaaa	cttaatacac	tccttaattg	aagaatcgca	5460
aaaccagcaa	gaaaagaatg	aacaagaatt	attggaatta	gataaatggg	caagtttgtg	5520
gaattgggtt	aacataacaa	attggctgtg	gtatataaaa	ttattcataa	tgatagtagg	5580
aggcttggtg	ggtttaagaa	tagtttttgc	tgtactttct	gtagtgaata	gagttaggca	5640
gggatattca	ccattttctt	ttcaggcctg	gagatctccc	gaggggaccc	gacaggcccg	5700
aaggaataga	agaagaaggt	ggagagagag	acagagacag	atccattcga	ccaattcact	5760
cctcaggtgc	aggctgccta	tcagaagggtg	gtggctgggtg	tggccaatgc	cctggctcac	5820
aaataccact	gagatccaga	catgataaga	tacattgatg	agtttggtgaca	aaccacaact	5880
agaatgcagt	gaaaaaaatg	ctttatttgt	gaaatttgtg	atgctattgc	tttatttgta	5940
accattataa	gctgcaataa	acaagttaac	aacaacaatt	gcattcattt	tatgtttcag	6000
gttcaggggg	aggtgtggga	ggttttttaa	agcaagtaaa	acctctacaa	atgtgggtatg	6060
gctgattatg	atccccagga	agctcctctg	tgtcctcata	aaccctaacc	tcctctactt	6120
gagaggacat	tccaatcata	ggctgccccat	ccaccctctg	tgtcctcctg	ttaattaggt	6180
cacttaacaa	aaaggaaaatt	gggtaggggt	ttttcacaga	ccgctttcta	agggtaat	6240
taaaatatct	gggaagtccc	ttccactgct	gtgttcaga	agtgttggtg	aacagcccac	6300

ES 2 470 440 B1

aaatgtcaac	agcagaaaca	tacaagctgt	cagctttgca	caagggccca	acaccctgct	6360
catcaagaag	cactgtgggt	gctgtgtag	taatgtgcaa	aacaggaggc	acattttccc	6420
cacctgtgta	ggttccaaaa	tatctagtgt	tttcattttt	acttgatca	ggaaccagc	6480
actccactgg	ataagcatta	tccttatcca	aaacagcctt	gtggtcagt	ttcatctgct	6540
gactgtcaac	tgtagcattt	tttggggtta	cagtttgagc	aggatatttg	gtcctgtagt	6600
ttgctaacac	accccagggt	gcacttttcg	gggaaatgtg	cgcggaaccc	ctatttgttt	6660
atttttctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	6720
tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	6780
cttttttgcg	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	6840
agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	6900
taagatcctt	gagagttttc	gccccgaaga	acgttttcca	atgatgagca	cttttaagt	6960
tctgctatgt	ggcgcggtat	tatcccgtat	tgacgccggg	caagagcaac	tcggtcgccg	7020
catacactat	tctcagaatg	acttggttga	gtactacca	gtcacagaaa	agcatcttac	7080
ggatggcatg	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagt	ataacactgc	7140
ggccaactta	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaatgag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	7200
catgggggat	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	7260
aaacgacgag	cgtgacacca	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaactatt	7320
aactggcgaa	ctacttactc	tagcttccc	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcgga	7380
taaagttgca	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	7440
atctggagcc	ggtgagcgtg	ggtctcgcgg	tatcattgca	gactggggc	cagatggtaa	7500
gccctcccgt	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	7560
tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggtaactgt	cagaccaagt	7620
ttactcatat	atactttaga	ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	7680
gaagatcctt	tttgataatc	tcatgaccaa	aatccttaac	gtgagttttc	gttccactga	7740
gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	7800
atctgctgct	tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttgttt	gccggatcaa	7860
gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	7920
gttcttctag	tgtagccgta	gttaggccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	7980
tacctcgctc	tgctaatacct	gttaccagt	gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	8040
accgggttgg	actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	8100
ggttcgtgca	cacagcccag	cttggagcga	acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	8160
cgtgagctat	gagaaagcgc	cacgcttccc	gaagggagaa	aggcggacag	gtatccggta	8220
agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	cagggggaaa	cgcctgggtat	8280
ctttatagtc	ctgtcgggtt	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	8340
tcaggggggc	ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	ccttttttacg	gttcctggcc	8400
ttttgctggc	cttttgctca	catgttcttt	cctgcgttat	cccctgattc	tgtggataac	8460


```

cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc      8520
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgcgct      8580
tggccgattc attaatgcag                                           8600

```

```

<210> 14
<211> 9219
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..9219
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9
      y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y
      9 del gen BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 1283..5550
<223> /note="Exones 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y secuencias flanqueantes de
      los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen BRCA2"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1282,5551..9219)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..9219
<223> /note="Minigen MGBR2_EX3-9"

```

```

<400> 14
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttattttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gctttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggaccc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctg ctgccttcag      600
tgagggctcg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tatcagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960

```

ES 2 470 440 B1

ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atggggtagg	gatcaccaga	attgtaacgc	1020
ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	gaagggcgat	cggtgcgggc	1080
ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	1140
aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	1200
cgactcacta	tagggcgaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtgg	1260
atcccccggg	ctgcaggaat	tccacacatc	cggacacaca	ttcgaagcca	tcttgtaact	1320
tttgtgaact	cttgttacac	ctttctatag	attcgcaaga	gaatggatta	atgatcttgt	1380
ttaattaata	tgccttaaca	aaagtaatcc	atagtcaaga	tcttaagcat	ttttttcctt	1440
atgatcttta	actgtttctg	gtcacaaatt	tgtctgtcac	tggttaaaac	taaggtggga	1500
tttttttttt	aaatagattt	aggaccaata	agtcttaatt	ggtttgaaga	actttcttca	1560
gaagctccac	cctataattc	tgaacctgca	gaagaatctg	aacataaaaa	caacaattac	1620
gaaccaaacc	tattttaaacc	tccacaaagg	aaaccatctt	ataatcagct	ggcttcaact	1680
ccaataatat	tcaaagagca	agggctgact	ctgccgctgt	accaatctcc	tgtaaaagaa	1740
ttagataaat	tcaaattaga	cttaggtaag	taatgcaata	tggtagactg	gggagaacta	1800
caaactagga	atttaggcaa	acctgtgtta	aaatcttagc	tcattcatta	attgtgtcat	1860
gctgggcaaa	tcagtctctc	tggcctcttt	ttcctcactc	gaaaaatgga	gacgatgaaa	1920
ataatgtctc	ataggtttgg	attaaattaa	ataatgtagg	tacttagtaa	atgttctctt	1980
tcatccctcc	tttgataaat	ttgccaaactg	agatttgctg	aattacgtct	ttcttatgcc	2040
aagaattcct	ctggtacatt	ggtaggtttt	cagtaaattgt	cttcccttac	tccttttttc	2100
tctttccttc	tgtttttggt	taaagcgaca	agatgttgct	cttttcccag	gctggaatac	2160
agtggcatga	tcatagctca	agctcctggg	ctcaagtgat	cctcccgctc	cagcctctca	2220
agtagctagg	actacaggca	tatcaccaca	ccagcgtttt	ctttgtagag	gcagagtctc	2280
actctgttgc	tcaggcaggt	gttgaactcc	tgcctcaagc	aatcctccca	cctcagcctc	2340
ccagagccct	caaattataa	gccactgtgc	tcggggcatc	ctttttgggg	ggtaatcagc	2400
aaactgaaaa	acctcttctt	acaactccct	atacattctc	attcccagta	tagaggagac	2460
tttttgtttt	taaacacttc	caaagaatgc	aaatttataa	tccagagtat	atacattctc	2520
actgaattat	tgtactgttt	caggaaggaa	tgttcccaat	agtagacata	aaagtcttcg	2580
cacagtgaaa	actaaaatgg	atcaagcaga	tgatgtttcc	tgtccacttc	taaattcttg	2640
tcttagtgaa	aggtatgatg	aagctattat	attaaaatat	ttaaataaaa	cattttccta	2700
catatatattg	ttctataaaag	atgaatctga	tttttatgct	aatatttttg	ctaagagcct	2760
ggtagaagat	cttacatttt	taaataatct	tttaggttga	gtcctttaat	agaatagttt	2820
ttacattaga	aacatgtaag	ttgttgttct	tgtgatgttg	aattggctgg	ttttctgtat	2880
attctgtgat	tttttaagta	acaaaaataa	cagtgggtgaa	aagcagtaag	tcagtccttg	2940
aattatcaat	ttaaaataaa	ttgtgtactt	ttcatctttg	gagagaatat	gatttacttt	3000
acaaattttt	tttttgtttt	tttttttttt	gagatggagt	ctctgtcacc	caggctgtag	3060
tgcagtgggtg	cgatctcagc	tcactgcaag	ctccgcctcc	cgggttcacg	ccattctcct	3120

ES 2 470 440 B1

gcctcagcct	cccaagtagc	tgggactaca	ggcgcccgcc	accatgcccg	gctaattttt	3180
tgtattttta	gtagagacgg	ggtttcactg	tgtagctag	gatggctctg	atttcctgac	3240
ctcgtgatcc	gcccgcctca	gcctcccaga	ctgctgggat	tacaggcgtg	aaccactgtg	3300
cccggcctac	tttacaaaat	ttttgagttt	aaaatacacg	gtttccagca	gctgaaattt	3360
gtgagtacat	atgtgttggc	attttaaaca	tcacttgatg	attatttaat	gcttcattag	3420
agattttactt	tttaaaatgt	aatataaaat	atctaaaagt	agtattccaa	caattttatat	3480
gaatgagaat	cttcttttta	aaataagata	aactagtttt	tgccagtttt	ttaaaataac	3540
ctaaggggatt	tgctttgttt	tatttttagtc	ctgttggttct	acaatgtaca	catgtaacac	3600
cacaaagaga	taagtcaggt	atgattaaaa	acaatgcttt	ttattccttag	aatactagaa	3660
atgttaataa	aaataaaact	taacaatttt	cccctttttt	tacccccagt	ggatatgtggg	3720
agtttgtttc	atacaccaaa	gtttgtgaag	gtaaatattc	tacctggttt	atttttatga	3780
cttagtaatt	gagaatttga	caatagcgtt	atacctttgc	cctgagattt	acaaatctgt	3840
acctagcatt	ctgcctcata	caggcaattc	agtaaacggt	aagtgaaata	aagagtgaat	3900
gaaaaaataa	tatccttaat	gatcagggca	tttctataaa	aaataaacta	ttttctttcc	3960
tcccagggtc	gtcagacacc	aaaacatatt	tctgaaagtc	taggagctga	ggtaggatcct	4020
gatatgtctt	ggtcaagttc	tttagctaca	ccaccacccc	ttagttctac	tgtgctcata	4080
ggtaataata	gcaaatgtgt	atttacaaga	aagagcagat	gagggtgata	attgtcatct	4140
ctaatacttc	tgttaaaagg	aaatatgaaa	agaaaatatt	agataatgtc	tttgataagt	4200
gtgttagtaa	ctgacaataa	ttttatttcta	ttaagtgtag	attggaataa	atacaaatac	4260
atttagtggt	agtccagtg	tgtcaagcat	tatgttttag	tacgatgtga	ttaacgtaga	4320
atagcttaca	aatattcctt	tactggccta	tataagcgtt	taagaggcag	tatttggtc	4380
gaggtcataa	cctcacagca	tcattctgact	ttccaactca	ttgtggacag	tattaccata	4440
aagtaatgat	caccaagcca	tatcttacca	ccttgtagat	agtactaagg	aagtaagtat	4500
agttttattca	ctgtgttgat	tgacctttct	aattactata	cttaagtact	tgaatcaatt	4560
cattttgttt	caaagtgtgc	atgtaataca	atagtagatg	tgctttttga	tgtctgacaa	4620
aaaataagtt	tttgatttct	agtgataata	tacaatacac	ataaattttt	atcttacagt	4680
cagaaatgaa	gaagcatctg	aaactgtatt	tcctcatgat	actactgctg	taagtaaata	4740
tgacattgat	tagactgttg	aaattgctaa	caattttgga	atgccttggt	aaattattta	4800
tcttacattt	ttaatttcct	aatctgtaat	ttatctaagc	ctttgagaaa	gtctctaaac	4860
ctggtcctat	atgtgatttt	aacttcctgt	gaaactctgc	tgtctctctg	ttaaagttga	4920
agcttttccta	gtggtgcaag	atttcatcac	actactcagg	atgacacaca	atttaaaact	4980
tactaattgc	ttacttctgg	aattttccat	taaaaatttt	tggacctagg	ttgattgcag	5040
ataactgaaa	tcaccaaag	tgaaaccatg	gataaggggg	gactactact	atatgtgcat	5100
tgagagtttt	tatactagt	attttaaact	ataatttttg	cagaatgtga	aaagctattt	5160
ttccaatcat	gatgaaagtc	tgaagaaaaa	tgatagattt	atcgcttctg	tgacagacag	5220

ES 2 470 440 B1

tgaaaacaca	aatcaaagag	aagctgcaag	tcatggtaag	tcctctgttt	agttgaacta	5280
caggtttttt	tgttgttggt	gttttgattt	tttttttttg	aggtggagtc	ttgctctgtc	5340
acccgtgatc	tcagttttacc	gcaacctctg	cctcccgtgc	tcaagcgatc	ctgcctcagc	5400
ttgccaagta	gctgagatta	caagcatgca	ccaccatgcc	caactattgt	attttttagta	5460
gagatggcat	ttcaccatgt	tggccaggct	ggtctcaaatt	ggtcgtgagc	caccatgccc	5520
agcctgaact	actcttttta	attggcacca	ggtaccagc	ttttgttccc	ttttgtgagg	5580
gttaattgcg	cgcttggcgt	aatcatggtc	atagctgttt	cctgtgtgaa	attgttatcc	5640
gctcacaatt	ccacacaaca	tacgagccgg	aagcataaag	tgtaaagcct	gggggtgccta	5700
atgagtgagc	taactcacat	taattgctgt	gcgctcactg	cccgccatat	gatacagagg	5760
tacataatgt	ttggggccaca	catgccggtg	taccacaga	ccccaacca	caagaagtag	5820
tattggtaaa	tgtgacagaa	aattttaaca	tgtggaaaaa	tgacatggta	gaacagatgc	5880
atgaggatat	aatcagttta	tgggatcaaa	gcctaaagcc	atgtgtagga	aaactacttt	5940
gcaccactgc	tgtgccttgg	aatgctagtt	ggagtaataa	atctctggaa	cagatttgga	6000
atcacacgac	ctggatggag	tgggacagag	aaattaacaa	ttacacaaac	ttaatacact	6060
ccttaattga	agaatcgcaa	aaccagcaag	aaaagaatga	acaagaatta	ttggaattag	6120
ataaatgggc	aagtttgtgg	aattggttta	acataacaaa	ttggctgtgg	tatataaaat	6180
tattcataat	gatagtagga	ggcttggtag	gtttaagaat	agtttttgct	gtactttctg	6240
tagtgaatag	agttaggcag	ggatattcac	cattttcttt	tcaggcctgg	agatctcccg	6300
aggggacccg	acaggcccga	aggaatagaa	gaagaagggtg	gagagagaga	cagagacaga	6360
tccattcgac	caattcactc	ctcagggtgca	ggctgcctat	cagaagggtg	tggctggtgt	6420
ggccaatgcc	ctggctcaca	aataccactg	agatccagac	atgataagat	acattgatga	6480
gtttggacaa	accacaacta	gaatgcagtg	aaaaaaatgc	tttatttgtg	aaatttgtga	6540
tgctattgct	ttatttgtaa	ccattataag	ctgcaataaa	caagttaaca	acaacaattg	6600
cattcatttt	atgtttcagg	ttcaggggga	ggtgtgggag	gttttttaaa	gcaagtaaaa	6660
cctctacaaa	tgtggtatgg	ctgattatga	tccccaggaa	gctcctctgt	gtcctcataa	6720
accctaacct	cctctacttg	agaggacatt	ccaatcatag	gctgcccatac	caccctctgt	6780
gtcctcctgt	taattagggtc	acttaacaaa	aaggaaattg	ggtagggggtt	tttcacagac	6840
cgctttctaa	gggtaatttt	aaaatatctg	ggaagtcctt	tccactgctg	tgttccagaa	6900
gtgttggtaa	acagcccaca	aatgtcaaca	gcagaaacat	acaagctgtc	agctttgcac	6960
aagggcccaa	caccctgctc	atcaagaagc	actgtgggtg	ctgtgttagt	aatgtgcaaa	7020
acaggaggca	cattttcccc	acctgtgtag	gttccaaaat	atctagtgtt	ttcattttta	7080
cttgatcag	gaaccagca	ctccactgga	taagcattat	ccttatccaa	aacagccttg	7140
tggtcagtgt	tcatctgctg	actgtcaact	gtagcatttt	ttgggggttac	agtttgagca	7200
ggatatttgg	tcctgtagt	tgctaacaca	ccccagggtg	cacttttcgg	ggaaatgtgc	7260
gcggaacccc	tatttgttta	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	ctcatgagac	7320
aataaccctg	ataaatgctt	caataatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	attcaacatt	7380

ES 2 470 440 B1

tccgtgtcgc	ccttattccc	ttttttgcgg	cattttgcct	tcctgttttt	gctcaccag	7440
aaacgctggg	gaaagtaaaa	gatgctgaag	atcagttggg	tgcacgagtg	ggttacatcg	7500
aactggatct	caacagcggg	aagatccttg	agagttttcg	ccccgaagaa	cgttttccaa	7560
tgatgagcac	ttttaaggtt	ctgctatgtg	gcgcgggtatt	atcccgtatt	gacgccgggc	7620
aagagcaact	cggtcgcggc	atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	tactcaccag	7680
tcacagaaaa	gcatcttacg	gatggcatga	cagtaagaga	attatgcagt	gctgccataa	7740
ccatgagtga	taacactgcg	gccaaacttac	ttctgacaac	gatcggagga	ccgaatgagc	7800
taaccgcttt	tttgacaaac	atggggggatc	atgtaactcg	ccttgatcgt	tgggaaccgg	7860
agctgaatga	agccatacca	aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctgta	gcaatggcaa	7920
caacgttgcg	caaactatta	actggcgaac	tacttactct	agcttcccgg	caacaattaa	7980
tagactggat	ggaggcggat	aaagttgcag	gaccacttct	gcgctcggcc	cttcgggctg	8040
gctggtttat	tgctgataaa	tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcgcggg	atcattgcag	8100
cactggggcc	agatggtaag	ccctcccgtg	tcgtagtatt	ctacacgacg	gggagtcagg	8160
caactatgga	tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	tgcctcactg	attaagcatt	8220
ggtaactgtc	agaccaagtt	tactcatata	tacttttagat	tgatttaaaa	cttcattttt	8280
aatttaaaaag	gatctagggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgaccaa	atccttaacg	8340
tgagttttcg	ttccactgag	cgtcagaccc	cgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	8400
tccttttttt	ctgcgcgtaa	tctgctgctt	gaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcggg	8460
ggtttggttg	ccggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	gcttcagcag	8520
agcgcagata	ccaaataactg	ttcttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	acttcaagaa	8580
ctctgtagca	ccgcctacat	acctcgcctt	gctaatactg	ttaccagtgg	ctgctgccag	8640
tggcgataag	tcgtgtctta	ccgggttgga	ctcaagacga	tagttaccgg	ataaggcgca	8700
gcggtcgggc	tgaacggggg	gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	cgacctacac	8760
cgaactgaga	tacctacagc	gtgagctatg	agaaagcgcc	acgcttcccg	aaggggagaaa	8820
ggcggacagg	tatccggtaa	gcggcagggt	cggaacagga	gagcgcacga	gggagcttcc	8880
aggggggaaac	gcctgggtatc	tttatagtcc	tgtcggggtt	cgccacctct	gacttgagcg	8940
tcgatttttg	tgatgctcgt	cagggggggcg	gagcctatgg	aaaaacgcca	gcaacgcggc	9000
cttttttacgg	ttcctggcct	tttgctggcc	ttttgctcac	atgttctttc	ctgcgttatc	9060
ccctgattct	gtggataacc	gtattaccgc	ctttgagtga	gctgataccg	ctcgccgcag	9120
ccgaacgacc	gagcgcagcg	agtcagtggg	cgaggaagcg	gaagagcgcc	caatacgcaa	9180
accgcctctc	cccgcgcgtt	ggccgattca	ttaatgcag			9219

<210> 15

<211> 9891

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

```

<222> 1..9891
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
      y 9 y secuencias flanqueantes de los intrones 1, 2, 3, 4, 5, 6,
      7, 8 y 9 del gen BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1246..6222
<223> /note="Exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y secuencias flanqueantes
      de los intrones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen BRCA2"

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1245,6223..9891)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..9891
<223> /note="Minigen MGBR2_EX2-9"

<400> 15
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtcaccag gtcaccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcacc aggcaccaca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggaccc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag      600
tgaggggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa taccagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc      1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cggtgcgggc      1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt      1140
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata      1200
cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccggaaac taaatcgtat      1260
gaaaatcctc ttctctagtc gcactagcca cgtttcgagt gcttaatgtg gctagtggca      1320
ccggtttgga cagcacagct gtaaaatgtt cccatcctca cagtaagctg ttaccgttcc      1380
aggagatggg actgaattag aattcaaaca aattttccag cgcttctgag ttttacctca      1440

```

ES 2 470 440 B1

gtcacataat	aaggaatgca	tccctgtgta	agtgcatttt	ggctcttctgt	tttgcagact	1500
tatttaccac	gcattggagg	aatatcgtag	gtaaaaaatgc	ctattggatc	caaagagagg	1560
ccaacatttt	ttgaaatttt	taagacacgc	tgcaacaaag	caggtattga	caaattttat	1620
ataactttat	aaattacacc	gagaaaagtg	tttctaataaa	atgcttgcta	aaaacccagt	1680
acgtcacagt	gttgcttaga	accataaact	gttccttatg	tgtgtataaa	tccagttaac	1740
aacataatca	tcgtttgcag	gttaaccaca	tgataaatat	agaacgtcta	gtggataaag	1800
aggaaactgg	ccccttgact	agcagtagga	acaattacta	acaaatcaga	agcattaatg	1860
ttacttttat	gcagaagttg	tccaactttt	tggttttcagt	actccttata	ctcttaaaaa	1920
tgatcttaga	cccccgaggt	gctttttgtt	atgtagctta	tccggacaca	cattcgaagc	1980
catcttgtaa	cttttgtgaa	ctcttgttac	acctttctat	agattcgcaa	gagaatggat	2040
taatgatctt	gtttaattaa	tatgccttaa	caaaagtaat	ccatagtcaa	gatcttaagc	2100
atTTTTTcc	ttatgatctt	taactgttct	gggtcacaaa	tttgtctgtc	actggttaaa	2160
actaagggtg	gatttttttt	ttaaatagat	ttaggaccaa	taagtcttaa	ttggtttgaa	2220
gaactttctt	cagaagctcc	accctataat	tctgaacctg	cagaagaatc	tgaacataaa	2280
aacaacaatt	acgaacccaa	cctattttaa	actccacaaa	ggaaaccatc	ttataatcag	2340
ctggcttcaa	ctccaataat	attcaaagag	caagggctga	ctctgccgct	gtaccaatct	2400
cctgtaaaag	aattagataa	attcaaatta	gacttaggta	agtaatgcaa	tatggtagac	2460
tggggagaac	tacaaactag	gaatttaggc	aaacctgtgt	taaaatctta	gctcattcat	2520
taattgtgtc	atgctgggca	aatcagctct	tctggcctct	tttccctcac	tcgaaaaatg	2580
gagacgatga	aaataatgtc	tcatagggtt	ggattaaatt	aaataatgta	ggtacttagt	2640
aaatgttctc	tttcatccct	cctttgataa	atttgccaac	tgagatttgc	tgaattacgt	2700
ctttcttatg	ccaagaattc	ctctgggtaca	ttggtagggt	ttcagtaaat	gtcttccctt	2760
actccttttt	tctctttcct	tctgcttttg	tttaaagcga	caagatgttg	ctcttttccc	2820
aggctggaat	acagtggcat	gatcatagct	caagctcctg	ggctcaagtg	atcctcccgc	2880
ctcagcctct	caagtagcta	ggactacagg	catatcacca	caccagcggt	ttctttgtag	2940
aggcagagtc	tactctgtt	gctcaggcag	gtgttgaact	cctgcctcaa	gcaatcctcc	3000
cacctcagcc	tcccagagcc	ctcaaattat	aagccactgt	gctcggggca	tccttttttg	3060
ggggtaatca	gcaaactgaa	aaacctcttc	ttacaactcc	ctataatttc	tcattcccag	3120
tatagaggag	actttttgtt	tttaaactac	tccaaagaat	gcaaatttat	aatccagagt	3180
atatacattc	tactgaatt	attgtactgt	ttcaggaagg	aatgttccca	atagtagaca	3240
taaaagtctt	cgcacagtga	aaactaaaa	ggatcaagca	gatgatgttt	cctgtccact	3300
tctaaattct	tgtcttagtg	aaaggtagta	tgaagctatt	atattaaaa	atttaaata	3360
aacattttcc	tacatatatt	tgttctataa	agatgaatct	gatttttatg	ctaataattt	3420
ggctaagagc	ctggtagaag	atcttacatt	tttaaataat	cttttaggtt	gagtccttta	3480
atagaatagt	ttttacatta	gaaacatgta	agttgttgtt	cttgtgatgt	tgaattggct	3540

ES 2 470 440 B1

ggtttttctgt	atatttctgtg	atttttttaag	taacaaaaaat	aacagtgggtg	aaaagcagta	3600
agtcagtcct	tgaattatca	atttaaaaata	aattgtgtac	ttttcatctt	tggagagaat	3660
atgatttact	ttacaaaattt	tttttttgtt	tttttttttt	ttgagatgga	gtctctgtca	3720
cccaggctgt	agtgacagtg	tgcgatctca	gctcactgca	agctccgcct	cccgggttca	3780
cgccatttctc	ctgcctcagc	ctcccaagta	gctgggacta	caggcgccccg	ccaccatgcc	3840
cggctaattt	tttgtatttt	tagtagagac	gggggtttcac	tgtgttagct	aggatgggtct	3900
cgatttcctg	acctcgtgat	ccgccccgcct	cagcctccca	gactgctggg	attacaggcg	3960
tgaaccactg	tgccccggcct	actttacaaa	atttttgagt	ttaaaataca	cggtttccag	4020
cagctgaaat	ttgtgagtac	atatgtgttg	gcattttaaa	catcacttga	tgattattta	4080
atgcttcatg	agagatttac	tttttaaaaat	gtaatatata	atatctaaaa	gtagtattcc	4140
aacaatttat	atgaatgaga	atcttctttt	aaaaataaga	taaactagtt	tttgccagtt	4200
ttttaaaata	acctaaggga	tttgctttgt	tttatttttag	tcctgttggt	ctacaatgta	4260
cacatgtaac	accacaaaga	gataagtcag	gtatgattaa	aaacaatgct	ttttattctt	4320
agaatactag	aaatgttaat	aaaaataaaa	cttaacaatt	ttcccccttt	tttaccacca	4380
gtggtatgtg	ggagtttgtt	tcatacacca	aagtttgtga	aggtaaatat	tctacctggt	4440
ttatttttat	gacttagtaa	ttgagaattt	gacaatagcg	ttataccttt	gccctgagat	4500
ttacaaatct	gtacctagca	ttctgcctca	tacaggcaat	tcagtaaacg	ttaagtgaac	4560
taaagagtga	atgaaaaaat	aatatcctta	atgatcaggg	catttctata	aaaaataaac	4620
tattttcttt	cctcccaggg	tcgtcagaca	ccaaaacata	tttctgaaag	tctaggagct	4680
gagggtggatc	ctgatatgtc	ttgggtcaagt	tcttttagcta	caccaccac	ccttagttct	4740
actgtgctca	taggtaataa	tagcaaatgt	gtattttaca	gaaagagcag	atgagggtga	4800
taattgtcat	ctctaatact	tctgttaaaa	ggaaatatga	aaagaaaata	ttagataatg	4860
tctttgataa	gtgtgttagt	aactgacaat	aattttattc	tattaagtgt	agattggaat	4920
aaatacaaat	acatttagtg	gtagtccagt	gggtgtcaagc	attatgtttt	agtacgatgt	4980
gattaacgta	gaatagctta	caaataattc	tttactggcc	tatataagcg	tttaagaggc	5040
agtatttggc	tcgaggtcat	aacctcacag	catcatctga	ctttccaact	cattgtggac	5100
agtattacca	taaagtaatg	atcaccaagc	catatcttac	caccttgtga	gtagtactaa	5160
ggaagtaagt	atagttttatt	cactgtgttg	attgaccttt	ctaattacta	tacttaagta	5220
cttgaatcaa	ttcattttgt	ttcaaatgtg	tcatgtaatc	aaatagtaga	tgtgcttttt	5280
gatgtctgac	aaaaaataag	tttttgcatt	ctagtataaa	tatacaatac	acataaattt	5340
ttatcttaca	gtcagaaatg	aagaagcatc	tgaaactgta	tttcctcatg	atactactgc	5400
tgtaagtaaa	tatgacattg	attagactgt	tgaaattgct	aacaattttg	gaatgccttg	5460
ttaaattatt	tatcttacat	ttttaatttc	ctaactctga	atttatctaa	gcctttgaga	5520
aagtctctaa	acctggctcct	atatgtgatt	ttaacttcct	gtgaaactct	gctgtctctc	5580
tgttaaagtt	gaagctttcc	tagtgggtga	agatttcac	acactactca	ggatgacaca	5640
caatttaaaa	cttactaatt	gcttacttct	ggaattttcc	attaaaaatt	tttggaacct	5700

ES 2 470 440 B1

ggttgattgc	agataactga	aatcaccaaa	agtgaacca	tggataaggg	gggactacta	5760
ctatatgtgc	attgagagtt	tttatactag	tgatttttaa	ctataatttt	tgcagaatgt	5820
gaaaagctat	ttttccaatc	atgatgaaag	tctgaagaaa	aatgatagat	ttatcgcttc	5880
tgtgacagac	agtgaaaaca	caaatcaaag	agaagctgca	agtcattggt	agtcctctgt	5940
ttagttgaac	tacaggtttt	tttggtgttg	ttgttttgat	tttttttttt	tgaggtggag	6000
tcttgctctg	tcacccgtga	tctcagttta	ccgcaacctc	tgccctccgt	gctcaagcga	6060
tcctgcctca	gcttgccaag	tagctgagat	tacaagcatg	caccaccatg	cccaactatt	6120
gtatttttag	tagagatggc	atttcaccat	gttgccagg	ctggctctca	atggctgtga	6180
gccaccatgc	ccagcctgaa	ctactctttt	taattggcac	caggtaccca	gcttttgttc	6240
ccttttgtga	gggttaattg	cgcgcttggc	gtaatcatgg	tcatagctgt	ttcctgtgtg	6300
aaattgttat	ccgctcaca	ttccacacaa	catacgagcc	ggaagcataa	agtgtaaagc	6360
ctggggtgcc	taatgagtga	gctaactcac	attaattgct	ttgcgctcac	tgcccgccat	6420
atgatacaga	ggtacataat	gtttgggcca	cacatgccgg	tgtaccaca	gacccaacc	6480
cacaagaagt	agtattggta	aatgtgacag	aaaattttta	catgtggaaa	aatgacatgg	6540
tagaacagat	gcatgaggat	ataatcagtt	tatgggatca	aagcctaaag	ccatgtgtag	6600
gaaaactact	ttgcaccact	gctgtgcctt	ggaatgctag	ttggagtaat	aatctctgtg	6660
aacagatttg	gaatcacacg	acctggatgg	agtgggacag	agaaattaac	aattacacaa	6720
acttaataca	ctccttaatt	gaagaatcgc	aaaaccagca	agaaaagaat	gaacaagaat	6780
tattggaatt	agataaatgg	gcaagtttgt	ggaattgggt	taacataaca	aattggctgt	6840
ggtatataaa	attattcata	atgatagtag	gaggcttggg	aggtttaaga	atagtttttg	6900
ctgtactttc	tgtagtgaat	agagttaggc	agggatattc	accattttct	tttcaggcct	6960
ggagatctcc	cgagggggacc	cgacaggccc	gaaggaatag	aagaagaagg	tggagagaga	7020
gacagagaca	gatccattcg	accaattcac	tcctcaggtg	caggctgcct	atcagaaggt	7080
ggtggctggg	gtggccaatg	ccctggctca	caaataccac	tgagatccag	acatgataag	7140
atacattgat	gagtttggac	aaaccacaa	tagaatgcag	tgaaaaaaat	gctttatttg	7200
tgaaatttgt	gatgctattg	ctttatttgt	aaccattata	agctgcaata	aacaagttaa	7260
caacaacaat	tgcattcatt	ttatgtttca	ggttcagggg	gaggtgtggg	agggttttta	7320
aagcaagtaa	aacctctaca	aatgtggtat	ggctgattat	gatccccagg	aagctcctct	7380
gtgtcctcat	aaaccctaac	ctcctctact	tgagaggaca	ttccaatcat	aggctgcccc	7440
tccaccctct	gtgtcctcct	gttaattagg	tcacttaaca	aaaaggaaat	tgggtagggg	7500
tttttcacag	accgctttct	aagggttaatt	ttaaaatatc	tgggaagtcc	cttccactgc	7560
tgtgttccag	aagtgttggg	aaacagccca	caaattgtcaa	cagcagaaac	atacaagctg	7620
tcagctttgc	acaagggccc	aacaccctgc	tcatacaaga	gcactgtggg	tgctgtgtta	7680
gtaatgtgca	aaacaggagg	cacattttcc	ccacctgtgt	aggttccaaa	atatctagtg	7740
ttttcatttt	tacttggatc	aggaaccagg	cactccactg	gataagcatt	atccttatcc	7800

ES 2 470 440 B1

aaaacagcct	tgtggtcagt	gttcatctgc	tgactgtcaa	ctgtagcatt	ttttgggggt	7860
acagtttgag	caggatattt	ggtcctgtag	tttgctaaca	caccccaggt	ggcacttttc	7920
ggggaaatgt	gcgcggaacc	cctattttgt	tatttttcta	aatacattca	aatatgtatc	7980
cgctcatgag	acaataaccc	tgataaatgc	ttcaataata	ttgaaaaagg	aagagtatga	8040
gtattcaaca	tttccgtgtc	gcccttattc	ccttttttgc	ggcattttgc	cttcctgttt	8100
ttgctcacc	agaaacgctg	gtgaaagtaa	aagatgctga	agatcagttg	ggcgcacgag	8160
tgggttacat	cgaactggat	ctcaacagcg	gtaagatcct	tgagagtttt	cgtcccgaag	8220
aacgttttcc	aatgatgagc	actttttaaag	ttctgctatg	tggcgcggta	ttatcccgtg	8280
ttgacgcccg	gcaagagcaa	ctcggctgcc	gcatacacta	ttctcagaat	gacttggttg	8340
agtactcacc	agtcacagaa	aagcatctta	cggatggcat	gacagtaaga	gaattatgca	8400
gtgctgccat	aaccatgagt	gataacactg	cggccaactt	acttctgaca	acgatcggag	8460
gaccgaatga	gctaaccgct	tttttgcaca	acatggggga	tcatgtaact	cgccttgatc	8520
gttgggaacc	ggagctgaat	gaagccatac	caaacgacga	gcgtgacacc	acgatgcctg	8580
tagcaatggc	aacaacgttg	cgcaaactat	taactggcga	actacttact	ctagcttccc	8640
ggcaacaatt	aatagactgg	atggaggcgg	ataaagttgc	aggaccactt	ctgcgctcgg	8700
cccttccggc	tggctggttt	attgctgata	aatctggagc	cggtgagcgt	gggtctcgcg	8760
gtatcattgc	agcactgggg	ccagatggta	agccctcccg	tatcgtagtt	atctacacga	8820
cggggagtc	ggcaactatg	gatgaacgaa	atagacagat	cgctgagata	ggcgcctcac	8880
tgattaagca	ttggtaactg	tcagaccaag	tttactcata	tatactttag	attgatttaa	8940
aacttcattt	ttaattttaa	aggatctagg	tgaagatcct	ttttgataat	ctcatgacca	9000
aaatccctaa	cgtgagtttt	cgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	9060
atcttcttga	gatccctttt	ttctgcgcgt	aatctgctgc	ttgcaaacia	aaaaaccacc	9120
gctaccagcg	gtggtttgtt	tgccggatca	agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	9180
tggcttcagc	agagcgcaga	taccaaatac	tgctcttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	9240
ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	atacctcgct	ctgctaattc	tgttaccagt	9300
ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	9360
ggataaggcg	cagcggctcg	gctgaacggg	gggttcgtgc	acacagccca	gcttgagcgc	9420
aacgacctac	accgaactga	gataacctaca	gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	9480
cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	aagcggcagg	gtcggaaacag	gagagcgcac	9540
gagggagcct	ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	9600
ctgacttgag	cgctgatttt	tgtgatgctc	gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	9660
cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	cttttgctgg	ccttttgctc	acatgttctt	9720
tcctgcgtta	tccccctgatt	ctgtggataa	ccgtattacc	gcctttgagt	gagctgatac	9780
cgctcgcggc	agccgaacga	ccgagcgcag	cgagtcagtg	agcgaggaag	cggaagagcg	9840
cccaatacgc	aaaccgcctc	tccccgcgcg	ttggccgatt	cattaatgca	g	9891

ES 2 470 440 B1

```

<210> 16
<211> 6497
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..6497
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 17 y 18 y secuencias
      flanqueantes de los intrones 16, 17 y 18 del gen BRCA2 de Homo
      sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1270..2775
<223> /note="Exones 17 y 18 y secuencias flanqueantes de los intrones
      16, 17 y 18 del gen BRCA2"

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1269,2776..6497)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..6497
<223> /note="Minigen MGBR2_EX17-18"

<400> 16
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggcctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttattttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggaccc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag      600
tgagggctctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tatcagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc      1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc      1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt      1140
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata      1200

```

ES 2 470 440 B1

cgactcacta	tagggcgaaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtgg	1260
atcccccggt	cagtatgata	ctttgataca	tgtcaaataa	ttttctgaaa	ttatattgta	1320
gatcatatga	actcataaaa	acttaatgat	cttgaacaat	gtagtttttg	tacagagaat	1380
agttgtagtt	gttgaattca	gtatcatcct	atgtgggtttt	tatgataata	ttctactttt	1440
atttgttcag	ggctctgtgt	gacactccag	gtgtggatcc	aaagcttatt	tctagaattt	1500
gggtttataa	tcactataga	tggatcatat	ggaaactggc	agctatggaa	tgtgcctttc	1560
ctaaggaatt	tgctaataga	tgccaaagcc	cagaaagggg	gcttcttcaa	ctaaaataca	1620
ggcaagttta	aagcattaca	ttacgtaatc	atatacggca	gtatgggttaa	ggtttctgtg	1680
tagtctgtga	cttccatgtc	aaaatgtttg	acaagccagt	tgtcagtgc	agttgccatc	1740
ccacactgct	gttctcctgt	catccctagc	ccccatttaa	gagagatcac	acattcatgc	1800
attgcttgct	tccctctttc	cccacccctt	ccttaacctc	ttgatgtatg	agaagaatat	1860
gagttactaa	tttgatccac	tatttgggga	ttgctaataa	agcatttttg	cattttattt	1920
tttgcttttt	aaaaataatt	gatattttta	caatatgaaa	caatatattc	ctagctacaa	1980
aatttttaat	tctcagtatt	tcttagataa	attcagtttt	tattctcagt	tattcagtga	2040
cttgtttaaa	cagtgggaatt	ctagagtcac	acttcctaaa	atatgcattt	ttgttttcac	2100
ttttagatat	gatacggaaa	ttgatagaag	cagaagatcg	gctataaaaa	agataatgga	2160
aagggatgac	acagctgcaa	aaacacttgt	tctctgtgtt	tctgacataa	tttcattgag	2220
cgcaaatata	tctgaaactt	ctagcaataa	aactagtagt	gcagataccc	aaaaagtggc	2280
cattattgaa	cttacagatg	ggtgggtatgc	tgtaagggcc	cagttagatc	ctcccctctt	2340
agctgtctta	aagaatggca	gactgacagt	tggtcagaag	attattcttc	atggagcaga	2400
actggtgggc	tctcctgatg	cctgtacacc	tcttgaagcc	ccagaatctc	ttatgttaaa	2460
ggtaaatata	tttgactctt	tggtaaaaat	cagtcattga	ttcagttaaa	ttctagaagt	2520
tttacattta	aatttttaaat	gcttactaag	gatgctcaat	ttcttagatg	tactgataat	2580
tttagtataa	aaagcatatt	cttcagacag	ttaaagtttt	tgtgcagttt	ttgggaggtc	2640
cagagatctt	tcttgagctt	aaataatgca	tttccaatta	aaaagcaaaa	taaatttgca	2700
ccatttgatt	ttggtatctg	tagcttgctg	ccctcttggt	ctcatagctt	tgctttgatc	2760
agatccctat	tccactgcag	gaattcgata	tcaagcttat	cgataccgtc	gacctcgagg	2820
gggggccccg	taccagctt	ttgttccctt	ttgtgagggt	taattgcgcg	cttggcgtaa	2880
tcatggtcac	agctgtttcc	tgtgtgaaat	tgttatccgc	tcacaattcc	acacaacata	2940
cgagccggaa	gcataaaagt	taaagcctgg	ggtgcctaata	gagtgcgcta	actcacatta	3000
attgcgttgc	gctcactgcc	cgccatata	tacagaggta	cataatgttt	gggccacaca	3060
tgccggtgta	cccacagacc	ccaaccacac	agaagtagta	ttggtaaatg	tgacagaaaa	3120
ttttaacatg	tggaaaaaat	acatggtaga	acagatgcat	gaggatataa	tcagtttatg	3180
ggatcaaagc	ctaaagccat	gtgtaggaaa	actactttgc	accactgctg	tgcccttgga	3240
tgctagttag	agtaataaat	ctctggaaca	gatttggaat	cacacgacct	ggatggagtg	3300
ggacagagaa	attaacaatt	acacaaactt	aatacactcc	ttaattgaag	aatcgcaaaa	3360

ES 2 470 440 B1

ccagcaagaa	aagaatgaac	aagaattatt	ggaattagat	aaatgggcaa	gtttgtggaa	3420
ttggtttaac	ataacaaatt	ggctgtggta	tataaaatta	ttcataatga	tagtaggagg	3480
cttggtaggt	ttaagaatag	tttttgctgt	actttctgta	gtgaatagag	ttaggcaggg	3540
atattcacca	ttttcttttc	aggcctggag	atctcccgag	gggacccgac	aggcccgaag	3600
gaatagaaga	agaaggtgga	gagagagaca	gagacagatc	cattcgacca	attcactcct	3660
caggtgcagg	ctgcctatca	gaaggtggtg	gctggtgtgg	ccaatgccct	ggctcacaaa	3720
taccactgag	atccagacat	gataagatac	attgatgagt	ttggacaaac	cacaactaga	3780
atgcagtga	aaaaatgctt	tatttgtgaa	atttgtgatg	ctattgcttt	atttgaacc	3840
attataagct	gcaataaaca	agttaacaac	aacaattgca	ttcattttat	gtttcaggtt	3900
cagggggagg	tgtgggaggt	tttttaaagc	aagtaaaacc	tctacaaatg	tggtatggct	3960
gattatgatc	cccaggaagc	tcctctgtgt	cctcataaac	cctaacctcc	tctacttgag	4020
aggacattcc	aatcataggc	tgcccatcca	ccctctgtgt	cctcctgtta	attaggtcac	4080
ttaacaaaaa	ggaaattggg	taggggtttt	tcacagaccg	ctttctaagg	gtaattttaa	4140
aatatctggg	aagtcccttc	cactgctgtg	ttccagaagt	gttggtaaac	agcccacaaa	4200
tgtcaacagc	agaaacatac	aagctgtcag	ctttgcacaa	gggccaaca	ccctgctcat	4260
caagaagcac	tgtggttgct	gtgttagtaa	tgtgcaaaac	aggaggcaca	ttttccccac	4320
ctgtgtaggt	tccaaaatat	ctagtgtttt	catttttact	tggtacagga	accagcact	4380
ccactggata	agcattatcc	ttatccaaaa	cagccttggtg	gtcagtgttc	atctgctgac	4440
tgtcaactgt	agcatttttt	ggggttacag	tttgagcagg	atatttggtc	ctgtagtttg	4500
ctaacacacc	ccaggtggca	cttttcgggg	aaatgtgctg	ggaacccta	tttgtttatt	4560
tttctaaata	cattcaaata	tgtatccgct	catgagacaa	taaccctgat	aaatgcttca	4620
ataatattga	aaaaggaaga	gtatgagtat	tcaacatttc	cggtgcgccc	ttattccctt	4680
ttttgcggca	ttttgccttc	ctgtttttgc	tcaccagaa	acgctggtga	aagtaaaaga	4740
tgctgaagat	cagttgggtg	cacgagtggg	ttacatcgaa	ctggatctca	acagcggtaa	4800
gatccttgag	agttttcgcc	ccgaagaacg	ttttccaatg	atgagcactt	ttaaagtctt	4860
gctatgtggc	gcggtattat	cccgtattga	cgccgggcaa	gagcaactcg	gtcgccgcat	4920
acactattct	cagaatgact	tggttgagta	ctcaccagtc	acagaaaagc	atcttacgga	4980
tggtcatgaca	gtaagagaat	tatgcagtgc	tgccataacc	atgagtgata	acactgcggc	5040
caacttactt	ctgacaacga	tcggaggacc	gaatgagcta	accgcttttt	tgcaacaat	5100
gggggatcat	gtaactcgcc	ttgatcgttg	ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	5160
cgacgagcgt	gacaccacga	tgctgttagc	aatggcaaca	acgttgcgca	aactattaac	5220
tggtgaacta	cttactctag	cttcccggca	acaattaata	gactggatgg	aggcggataa	5280
agttgcagga	ccacttctgc	gctcggccct	tccggctggc	tggtttattg	ctgataaatc	5340
tggtgaccgt	gagcgtgggt	ctcgcggtat	cattgcagca	ctggggccag	atggtaagcc	5400
ctcccgatc	gtagttatct	acacgacggg	gagtcaggca	actatggatg	aacgaaatag	5460

ES 2 470 440 B1

```

acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta      5520
ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa      5580
gatccttttt gataatctca tgaccaaaat ccttaacgtg agttttcggt ccactgagcg      5640
tcagaccccc tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc      5700
tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag      5760
ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactggt      5820
cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac      5880
ctcgctctgc taatcctggt accagtgggt gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc      5940
gggttggaact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt      6000
tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt      6060
gagctatgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc      6120
ggcaggggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc ctggatatctt      6180
tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca      6240
ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt      6300
tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt      6360
attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag      6420
tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg      6480
ccgattcatt aatgcag                                     6497

```

```

<210> 17
<211> 7252
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..7252
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 16, 17 y 18 y
      secuencias flanqueantes de los intrones 15, 16, 17 y 18 del gen
      BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 1270..3530
<223> /note="Exones 16, 17 y 18 y secuencias flanqueantes de los
      intrones 15, 16, 17 y 18 del gen BRCA2"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1269,3531..7252)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..7252
<223> /note="Minigen MGBR2_EX16-18"

```

```

<400> 17
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccc      120

```

ES 2 470 440 B1

gcaggcagaa	gtatgcaaag	catgcatctc	aattagtcag	caaccatagt	cccgccccta	180
actccgcccc	tcccgcccct	aactccgccc	agttccgccc	attctccgcc	ccatggctga	240
ctaatttttt	ttattttatgc	agaggccgag	gccgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	300
tagtgaggag	gcttttttgg	aggcctaggc	ttttgcaaaa	aacttggact	gtgtttactt	360
gcaatcccc	aaaacagaca	gaatggtgca	tctgtccagt	gaggagaagt	ctgcggtcac	420
tgccctgtgg	ggcaagggtga	atgtggaaga	agttggtggt	gaggccctgg	gcaggctgct	480
ggttgtctac	ccatggaccc	agaggttctt	cgagtccttt	ggggacctgt	cctctgcaaa	540
tgctgttatg	aacaatccta	aggtgaaggc	tcatggcaag	aaggtgctgg	ctgccttcag	600
tgaggggtctg	agtcacctgg	acaacctcaa	aggcaccttt	gctaagctga	gtgaactgca	660
ctgtgacaag	ctgcacgctc	tagagtcgac	ccagcagtaa	gtaatacatg	taatgcaacc	720
tatacaaata	gcaatagtag	cattagtagt	agcaataata	atagcaatag	ttgtgtggtc	780
catagtaatc	atagaatata	ggaaaatatt	aagacaaaga	aaaatagaca	ggttaattga	840
tagactaata	gaaagagcag	aagacagtgg	caatgagagt	gaaggagaaa	tatcagcact	900
tgtggagatg	gggggtggaga	tggggcacca	tgctccttgg	gatgttgatg	atctgtagtg	960
ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atggggtagg	gatcaccaga	attgtaacgc	1020
ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	gaagggcgat	cgggtcgggc	1080
ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	1140
aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	1200
cgactcacta	tagggcggaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtgg	1260
atcccccggc	ccttttgttt	cccatctaag	tttttgaact	taagagattt	tgtaaaacat	1320
cacatttttt	tatcctcaca	gtaccttcct	atggcagatt	tagcaggagg	cgtataaacg	1380
gggtggaaaa	ggtacagcag	actgtggaat	gtatggatca	tttatattac	attaaaattt	1440
ttagtttcta	gtaaataact	taaatgtttt	tgtagtgaag	attctagtag	ttaatgaaaa	1500
tttttggtaa	attcagtttt	ggtttgttat	aattgttttt	attgtgtgat	acatgtttac	1560
tttaaatgtg	ttttcttttt	tgtgtgtggt	tattttgtgt	agctgtatac	gtatggcgtt	1620
tctaaacatt	gcataaaaaat	taacagcaaa	aatgcagagt	cttttcagtt	tcacactgaa	1680
gattattttg	gtaaggaaaag	tttatggact	ggaaaaggaa	tacagttggc	tgatggtgga	1740
tggctcatac	cctccaatga	tggaaaggct	ggaaaagaag	aattttatag	gtactctatg	1800
caaaaagatt	gtgtgttaac	ttttatgtat	tccctcatcc	ctctttcttc	tcttaactgt	1860
ctctcgaact	aaaaagttag	ctagaaatca	aatttttatg	catttaattg	ttttaagtgc	1920
attatgggtta	agcattctgt	agaagtcttt	tgaaaagtgc	tgtttgtcct	ggggtttaat	1980
gaactggatt	ttcttgattt	gggacatttt	tcttaggcac	ttattcagta	tgatactttg	2040
atacatgtca	aataattttc	tgaaattata	ttgtagatca	tatgaactca	taaaaactta	2100
atgatcttga	acaatgtagt	ttttgtacag	agaatagttg	tagttgttga	attcagtatc	2160
atcctatgtg	gtttttatga	taatattcta	cttttatattg	ttcagggctc	tgtgtgacac	2220

ES 2 470 440 B1

tccagggtgtg	gatccaaagc	ttattttctag	aattttgggtt	tataatcact	atagatggat	2280
catatggaaa	ctggcagcta	tggaaatgtgc	ctttcctaag	gaatttgcta	atagatgcct	2340
aagcccagaa	agggtgcctt	ttcaactaaa	atacaggcaa	gtttaaagca	ttacattacg	2400
taatcatata	cggcagtatg	gttaagggttt	ctgtgtagtc	tgtgacttcc	atgtcaaaat	2460
gttgcacaa	ccagttgtca	gtgacagtgt	ccatcccaca	ctgctgttct	cctgtcatcc	2520
ctagccccca	tttaagagag	atcacacatt	catgcattgc	ttgcttcctt	ctttccccac	2580
cccctcctta	acctcttgat	gtatgagaag	aatatgagtt	actaatttga	tccactattt	2640
ggggattgct	aataaaagcat	ttttgcattt	tatttttttgc	tttttaaaaa	taattgatat	2700
tttaacaata	tgaacaata	tattcctagc	tacaaaattt	ttaattctca	gtatttctta	2760
gataaattca	gtttttattc	tcagttattc	agtgacttgt	ttaaacagtg	gaattctaga	2820
gtcacacttc	ctaaaatatg	cattttttgtt	ttcactttta	gatatgatac	ggaaattgat	2880
agaagcagaa	gatcggctat	aaaaaagata	atggaaagg	atgacacagc	tgcaaaaaca	2940
cttgttctct	gtgtttctga	cataatttca	ttgagcgcaa	atatactga	aacttctagc	3000
aataaaaacta	gtagtgcaga	tacccaaaaa	gtggccatta	ttgaacttac	agatgggttg	3060
tatgctgtta	aggcccagtt	agatcctccc	ctcttagctg	tcttaaagaa	tggcagactg	3120
acagttggtc	agaagattat	tcttcatgga	gcagaactgg	tgggctctcc	tgatgcctgt	3180
acacctcttg	aagccccaga	atctcttatg	ttaaaggtaa	attaatttgc	actcttggtg	3240
aaaatcagtc	attgattcag	ttaaattcta	gaagttttac	atttaaattt	taaatgctta	3300
ctaaggatgc	tcaatttctt	agatgtactg	ataattttag	tataaaaagc	atattcttca	3360
gacagttaaa	gtttttgtgc	agtttttggg	aggtccagag	atctttcttg	agcttaaata	3420
atgcatttcc	aattaaaaag	caaaataaat	ttgcaccatt	tgattttggt	atctgtagct	3480
tgctgcccct	ttgttctcat	agctttgctt	tgatcagatc	cctattccac	tgcaggaatt	3540
cgatatcaag	cttatcgata	ccgtcgacct	cgaggggggg	cccggtagcc	agcttttgtt	3600
cccttttgtg	agggttaatt	gcgcgcttgg	cgtaatcatg	gtcatagctg	tttcctgtgt	3660
gaaattgtta	tccgctcaca	attccacaca	acatacgagc	cggaagcata	aagtgtaaag	3720
cctgggggtgc	ctaattgagt	agctaactca	cattaattgc	gttgcgctca	ctgcccgcga	3780
tatgatacag	aggtagataa	tgtttggggc	acacatgccg	gtgtaccac	agacccaac	3840
ccacaagaag	tagtattggt	aaatgtgaca	gaaaatttta	acatgtggaa	aaatgacatg	3900
gtagaacaga	tgcatgagga	tataatcagt	ttatgggatc	aaagcctaaa	gccatgtgta	3960
ggaaaactac	tttgcaccac	tgctgtgcct	tggaaatgcta	gttggagtaa	taaatctctg	4020
gaacagattt	ggaatcacac	gacctggatg	gagtgaggaca	gagaaattaa	caattacaca	4080
aacttaatac	actccttaat	tgaagaatcg	caaaaccagc	aagaaaagaa	tgaacaagaa	4140
ttattggaat	tagataaatg	ggcaagtttg	tgggaattggt	ttaacataac	aaattggctg	4200
tggtatataa	aattattcat	aatgatagta	ggaggcttgg	taggtttaag	aatagttttt	4260
gctgtacttt	ctgtagtgaa	tagagttagg	cagggatatt	caccattttc	ttttcaggcc	4320
tggagatctc	ccgagggggac	ccgacaggcc	cgaaggaata	gaagaagaag	gtggagagag	4380

ES 2 470 440 B1

agacagagac	agatccattc	gaccaattca	ctcctcaggt	gcaggctgcc	tatcagaagg	4440
tgggtggctgg	tgtggccaat	gccctggctc	acaaatacca	ctgagatcca	gacatgataa	4500
gatacattga	tgagtttgga	caaaccacaa	ctagaatgca	gtgaaaaaaa	tgctttattt	4560
gtgaaatttg	tgatgctatt	gctttatttg	taaccattat	aagctgcaat	aaacaagtta	4620
acaacaacaa	ttgcattcat	tttatgtttc	aggttcaggg	ggagggtgtgg	gagggtttttt	4680
aaagcaagta	aaacctctac	aaatgtggta	tggctgatta	tgatccccag	gaagctcctc	4740
tgtgtcctca	taaaccctaa	cctcctctac	ttgagaggac	attccaatca	taggctgccc	4800
atccaccctc	tgtgtcctcc	tgtaatttag	gtcacttaac	aaaaaggaaa	ttgggtaggg	4860
gtttttcaca	gaccgctttc	taagggtaat	tttaaaatat	ctgggaagtc	ccttccactg	4920
ctgtgttcca	gaagtgttgg	taaacagccc	acaaatgtca	acagcagaaa	catacaagct	4980
gtcagctttg	cacaagggcc	caacaccctg	ctcatcaaga	agcactgtgg	ttgctgtgtt	5040
agtaatgtgc	aaaacaggag	gcacattttc	cccacctgtg	taggttccaa	aatatctagt	5100
gttttcattt	ttacttggat	caggaaccca	gcactccact	ggataagcat	tatccttatc	5160
caaaacagcc	ttgtggctcag	tgttcatctg	ctgactgtca	actgtagcat	tttttgggggt	5220
tacagtttga	gcaggatatt	tggtcctgta	gtttgctaac	acaccccagg	tggcactttt	5280
cggggaaaatg	tgcgcggaac	ccctatttgt	ttattttttct	aaatacattc	aaatatgtat	5340
ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	cttcaataat	attgaaaaag	gaagagtatg	5400
agtattcaac	atttccgtgt	cgcccttatt	cccttttttg	cggcattttg	ccttcctgtt	5460
tttgctcacc	cagaaacgct	ggtgaaagta	aaagatgctg	aagatcagtt	gggtgcacga	5520
gtgggttaca	tcgaactgga	tctcaacagc	ggtaagatcc	ttgagagttt	tcgccccgaa	5580
gaacgttttc	caatgatgag	cactttttaa	gttctgctat	gtggcgcggt	attatcccgt	5640
attgacgccg	ggcaagagca	actcggtcgc	cgcatacact	attctcagaa	tgacttgggt	5700
gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	tgacagtaag	agaattatgc	5760
agtgctgcca	taaccatgag	tgataacact	gcggccaact	tacttctgac	aacgatcgga	5820
ggaccgaatg	agctaaccgc	ttttttgcac	aacatggggg	atcatgtaac	tcgccttgat	5880
cgttggggaa	cggagctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	agcgtgacac	cacgatgcct	5940
gtagcaatgg	caacaacgtt	gcgcaaacta	ttaactggcg	aactacttac	tctagcttcc	6000
cggcaacaat	taatagactg	gatggaggcg	gataaagttg	caggaccact	tctgcgctcg	6060
gcccttccgg	ctggctgggt	tattgctgat	aaatctggag	ccggtgagcg	tgggtctcgc	6120
ggtatcattg	cagcactggg	gccagatggg	aagccctccc	gtatcgtagt	tatctacacg	6180
acgggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	aatagacaga	tcgctgagat	aggtgcctca	6240
ctgattaagc	attggtaact	gtcagaccaa	gtttactcat	atatacttta	gattgattta	6300
aaacttcatt	tttaatttaa	aaggatctag	gtgaagatcc	tttttgataa	tctcatgacc	6360
aaaatcctta	acgtgagttt	tcgttccact	gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaag	6420
gatcttcttg	agatcctttt	tttctgcgcg	taatctgctg	cttgcaaaca	aaaaaaccac	6480

ES 2 470 440 B1

```

cgctaccagc ggtgggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa      6540
ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc      6600
accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag      6660
tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac      6720
cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc      6780
gaacgacctc caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc      6840
ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcgggaaca ggagagcgca      6900
cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttgccacc      6960
tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg      7020
ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct      7080
ttctgctggt atccccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata      7140
ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc      7200
gccaataacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc ag              7252

```

```

<210> 18
<211> 8340
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..8340
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 16, 17, 18, 19 y 20
      y secuencias flanqueantes de los intrones 15, 16, 17, 18, 19 y
      20 del gen BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1270..4671
<223> /note="Exones 16, 17, 18, 19 y 20 y secuencias flanqueantes de
      los intrones 15, 16, 17, 18, 19 y 20 del gen BRCA2"

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1269,4672..8340)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..8340
<223> /note="Minigen MGBR2_EX16-20"

```

```

<400> 18
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtcgccag gtcgccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcgcc aggcctccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccggcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttattttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gctttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420

```

ES 2 470 440 B1

tgccctgtgg	ggcaagggtga	atgtggaaga	agttggtggt	gaggccctgg	gcaggctgct	480
ggttgtctac	ccatggaccc	agagggttctt	cgagtccttt	ggggacctgt	cctctgcaaa	540
tgctgttatg	aacaatccta	agggtgaaggc	tcatggcaag	aagggtgctgg	ctgccttcag	600
tgagggctctg	agtcacctgg	acaacctcaa	aggcaccttt	gctaagctga	gtgaactgca	660
ctgtgacaag	ctgcacgctc	tagagtcgac	ccagcagtaa	gtaatacatg	taatgcaacc	720
tatacaaata	gcaatagtag	cattagtagt	agcaataata	atagcaatag	ttgtgtggtc	780
catagtaatc	atagaatata	ggaaaatatt	aagacaaaga	aaaatagaca	ggttaattga	840
tagactaata	gaaagagcag	aagacagtgg	caatgagagt	gaaggagaaa	tatcagcact	900
tgtggagatg	ggggtggaga	tggggcacca	tgctccttgg	gatgttgatg	atctgtagtg	960
ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atggggtagg	gatcaccaga	attgtaacgc	1020
ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	gaagggcgat	cgggtcgggc	1080
ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	1140
aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	1200
cgactcacta	tagggcgaaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtgg	1260
atcccccggc	ccttttgttt	cccattctaag	tttttgaact	taagagattt	tgtaaaacat	1320
cacatttttt	tatcctcaca	gtaccttctt	atggcagatt	tagcaggagg	cgtataaacg	1380
gggttgaaaa	ggtacagcag	actgtggaat	gtatggatca	tttatattac	attaaaattt	1440
ttagtttcta	gtaaataact	taaatgtttt	tgtagtgaag	attctagtag	ttaatgaaaa	1500
tttttggtaa	attcagtttt	ggtttgttat	aattgttttt	attgtgtgat	acatgtttac	1560
tttaaatgtt	ttttcttttt	tgtgtgtgtt	tattttgtgt	agctgtatac	gtatggcgtt	1620
tctaaacatt	gcataaaaat	taacagcaaa	aatgcagagt	cttttcagtt	tcacactgaa	1680
gattattttg	gtaaggaaag	tttatggact	ggaaaaggaa	tacagttggc	tgatggtgga	1740
tggctcatat	cctccaatga	tggaaaggct	ggaaaagaag	aattttatag	gtactctatg	1800
caaaaagatt	gtgtgttaac	ttttatgtat	tccctcatcc	ctctttcttc	tcttaactgt	1860
ctctcgaact	aaaaagttgg	ctagaaatca	aatttttatg	catttaattg	ttttaagtgc	1920
attatgggta	agcattctgt	agaagtcttt	tgaaaagtgc	tgtttgcctt	ggggtttaat	1980
gaactggatt	ttcttgattt	gggacatttt	tcttaggcatt	ttattcagta	tgatactttg	2040
atacatgtca	aataattttt	tgaaattata	ttgtagatca	tatgaactca	taaaaactta	2100
atgatcttga	acaatgtagt	ttttgtacag	agaatagttg	tagttgttga	attcagtatc	2160
atcctatgtg	gtttttatga	taatattcta	cttttatattg	ttcagggctc	tgtgtgacac	2220
tccagggtgtg	gatccaaagc	ttattttctag	aattttgggtt	tataatcact	atagatggat	2280
catatggaaa	ctggcagcta	tggaaatgtgc	ctttcctaag	gaatttgcta	atagatgcct	2340
aagcccagaa	agggtgcttc	ttcaactaaa	atacaggcaa	gttttaaagca	ttacattacg	2400
taatcatata	cggcagtatg	gttaagggtt	ctgtgtagtc	tgtgacttcc	atgtcaaaat	2460
gttgacacaag	ccagttgtca	gtgacagttg	ccatcccaca	ctgctgttct	cctgtcatcc	2520

ES 2 470 440 B1

ctagccccc	tttaagagag	atcacacatt	catgcattgc	ttgcttccct	ctttccccc	2580
ccccctcta	acctcttgat	gtatgagaag	aatatgagtt	actaatttga	tccactat	2640
ggggattgct	aataaagcat	ttttgcattt	tattttttgc	tttttaaaaa	taattgat	2700
tttaacaata	tgaacaata	tattcctagc	tacaaaattt	ttaattctca	gtatttctta	2760
gataaattca	gtttttattc	tcagttattc	agtgacttgt	ttaaacagtg	gaattctaga	2820
gtcacacttc	ctaaaatatg	catttttgtt	ttcactttta	gatatgatac	ggaaattgat	2880
agaagcagaa	gatcggctat	aaaaaagata	atggaaaggg	atgacacagc	tgcaaaaaca	2940
cttgttctct	gtgtttctga	cataatttca	ttgagcgcaa	atatactctga	aacttctagc	3000
aataaaacta	gtagtgcaga	tacccaaaaa	gtggccatta	ttgaacttac	agatgggtgg	3060
tatgctgtta	aggcccagtt	agatcctccc	ctcttagctg	tcttaaagaa	tggcagactg	3120
acagttggtc	agaagattat	tcttcatgga	gcagaactgg	tggtctctcc	tgatgcctgt	3180
acacctcttg	aagccccaga	atctcttatg	ttaaaggtaa	attaatttgc	actcttggtta	3240
aaaatcagtc	attgattcag	ttaaattcta	gaagttttac	atttaaattt	taaatgctta	3300
ctaaggatgc	tcaatttctt	agatgtactg	ataatttttag	tataaaaagc	atattcttca	3360
gacagttaaa	gtttttgtgc	agtttttggg	aggtccagag	atctttcttg	agcttaataa	3420
atgcatttcc	aattaaaaag	caaaataaat	ttgcaccatt	tgattttggg	atctgtagct	3480
tgctgccctc	ttgttctcat	agctttgctt	tgatcagatc	cctattccac	atagcattaa	3540
gaacttgtag	cagtataaac	aatatgtttg	agaagtacta	tattgtgaaa	atattttcac	3600
ttttatacag	ttttttactt	atttactgtc	ttactaatct	tcctaagact	ttttaaagtg	3660
aatattttta	aggcagttct	agaagaatga	aaactcttat	gatattctgta	atagaattga	3720
atacatat	aactactaaa	tcaatatatt	tattaatttg	tccagatttc	tgctaacagt	3780
actcggcctg	ctcgttggtta	taccaaactt	ggattctttc	ctgaccctag	accttttcct	3840
ctgcccttat	catcgctttt	cagtgatgga	ggaaatgttg	gttggtgtga	tgtaattatt	3900
caaagagcat	accctataca	ggtatgatgt	attcttgaaa	cttaccatat	atttctttct	3960
tttgatacaa	ttaatttgtt	tgtttgtttg	agatggagtt	tcggtctctt	gccaggtg	4020
gagtgcattg	gcgtgatctt	ggttcactgc	agcctccacc	tcccgggttc	aagtgattct	4080
cctgcctcag	cctctcaagt	agctgagcca	ccacacctgg	ctaattttgt	atttttggtta	4140
gagaaggggt	ttcatcatgt	tggtcaggct	gatctcgaac	tcctgacctc	aggtgatcca	4200
ctaattctcag	cctcccaaag	ttctgggatt	acagatgtga	gccactgtgc	ctggcctgat	4260
acaattaact	tgaatgttat	atatgtgact	tttttggtgt	gtgtaacaca	ttattacagt	4320
ggatggagaa	gacatcatct	ggattataca	tatttcgcaa	tgaagagag	gaagaaaagg	4380
aagcagcaaa	atatgtggag	gccaacaaa	agagactaga	agccttattc	actaaaattc	4440
aggaggaatt	tgaagaacat	gaaggtaaaa	ttagttatat	ggtacacatt	gttatttcta	4500
atatgagaac	aaagtcttag	agactttgaa	tttaacattt	ttaatgagta	aattgttttt	4560
attttgagta	gtaaattgac	tttatttttt	agtatctagg	gtattctttt	ttggtgttag	4620
acaaagaata	gcaacaaggg	acagaaatat	caggtctaag	ccatttgtaa	tggtaccag	4680

ES 2 470 440 B1

cttttgttcc	cttttgtgag	ggttaattgc	gcgcttggcg	taatcatggt	catagctggt	4740
tcctgtgtga	aattgttatc	cgctcacaat	tccacacaac	atacgagccg	gaagcataaa	4800
gtgtaaagcc	tgggggtgcct	aatgagtgag	ctaactcaca	ttaattgcgt	tgcgctcact	4860
gccccgccata	tgatacagag	gtacataatg	tttggggccac	acatgccggt	gtacccacag	4920
accccaaccc	acaagaagta	gtattggtaa	atgtgacaga	aaattttaac	atgtggaaaa	4980
atgacatggt	agaacagatg	catgaggata	taatcagttt	atgggatcaa	agcctaaagc	5040
catgtgtagg	aaaactactt	tgcaccactg	ctgtgccttg	gaatgctagt	tggagtaata	5100
aatctctgga	acagattttg	aatcacacga	cctggatgga	gtgggacaga	gaaattaaca	5160
attacacaaa	cttaatacac	tccttaattg	aagaatcgca	aaaccagcaa	gaaaagaatg	5220
aacaagaatt	attggaatta	gataaatggg	caagtttgtg	gaattggttt	aacataacaa	5280
attggctgtg	gtatataaaa	ttattcataa	tgatagtagg	aggcttggtg	ggtttaagaa	5340
tagtttttgc	tgtactttct	gtagtgaata	gagttaggca	gggatattca	ccattttctt	5400
ttcaggcctg	gagatctccc	gaggggaccc	gacaggcccc	aaggaataga	agaagaaggt	5460
ggagagagag	acagagacag	atccattcga	ccaattcact	cctcaggtgc	aggctgccta	5520
tcagaaggtg	gtggctggtg	tggccaatgc	cctggctcac	aaataccact	gagatccaga	5580
catgataaga	tacattgatg	agtttggaca	aaccacaact	agaatgcagt	gaaaaaaatg	5640
ctttatttgt	gaaatttgtg	atgctattgc	tttatttgta	accattataa	gctgcaataa	5700
acaagttaac	aacaacaatt	gcattcattt	tatgtttcag	gttcaggggg	aggtgtggga	5760
ggttttttaa	agcaagtaaa	acctctacaa	atgtgggtatg	gctgattatg	atccccagga	5820
agctcctctg	tgtcctcata	aaccctaacc	tcctctactt	gagaggacat	tccaatcata	5880
ggctgccccat	ccaccctctg	tgtcctcctg	ttaattaggt	cacttaacaa	aaaggaaatt	5940
gggtaggggt	ttttcacaga	ccgctttcta	agggttaattt	taaaatatct	gggaagtccc	6000
ttccactgct	gtgttccaga	agtgttggtg	aacagcccac	aatgtcaac	agcagaaaca	6060
tacaagctgt	cagctttgca	caagggccca	acaccctgct	catcaagaag	cactgtgggt	6120
gctgtgttag	taatgtgcaa	aacaggaggc	acattttccc	cacctgtgta	ggttccaaaa	6180
tatctagtgt	tttcattttt	acttggatca	ggaaccagc	actccactgg	ataagcatta	6240
tccttatcca	aaacagcctt	gtggtcagtg	ttcatctgct	gactgtcaac	tgtagcattt	6300
tttgggggtta	cagtttgagc	aggatatattg	gtcctgtagt	ttgctaacac	accccaggtg	6360
gcacttttctg	gggaaatgtg	cgcggaaccc	ctatttgttt	atttttctaa	atacattcaa	6420
atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	tcaataatat	tgaaaaagga	6480
agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	cttttttgcg	gcattttgcc	6540
ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	agatgctgaa	gatcagttgg	6600
gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	taagatcctt	gagagttttc	6660
gccccgaaga	acgtttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	tctgctatgt	ggcgcggtat	6720
tatcccgtat	tgacgccggg	caagagcaac	tcggctcgccg	catacactat	tctcagaatg	6780

ES 2 470 440 B1

```

acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag      6840
aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa      6900
cgatcggagg accgaatgag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc      6960
gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca      7020
cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gaaaactatt aactggcgaa ctacttactc      7080
tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc      7140
tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg      7200
ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgat atcgtagtta      7260
tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag      7320
gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga      7380
ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc      7440
tcatgaccaa aatccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa      7500
gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaaaaa      7560
aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc      7620
gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta      7680
gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct      7740
gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg      7800
atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag      7860
cttgagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc      7920
cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg      7980
agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcggggt      8040
tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg      8100
gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca      8160
catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cttttgagtg      8220
agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc      8280
ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag      8340

```

```

<210> 19
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..50
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para delecionar 1,2 kilobases del intron
      del plásmido pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

```

```

<400> 19
ggatcaaagc ctaaagccat gtgtaggaaa actactttgc accactgctg      50

```

```

<210> 20

```

```

<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..50
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para deletar 1,2 kilobases del intron
      del plásmido pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 20
cagcagtggg gcaaagtagt tttcctacac atggctttag gctttgatcc      50

<210> 21
<211> 2961
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..2961
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pBluescript II KS (-)"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 21
ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtgggttacg cgcagcgtga      60
ccgctacact tgccagcgcc ctagcgcccg ctcttttcgc tttcttcctt tcctttctcg      120
ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat      180
ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggtagtggt tcacgtagtg      240
ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata      300
gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt      360
tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat      420
ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg      480
caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg      540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg      600
taaaacgcag gccagtgagc gcgcgtaata cgactacta tagggcgaat tggagctcca      660
ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg atcccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa      720
gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg gcccggtacc cagcttttgt tccctttagt      780
gaggggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattggt      840
atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg      900
cctaatagag gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg      960
gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc      1020
gtattgggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc      1080
ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata      1140
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggc agcaaaaagg caggaaccgt aaaaaggccg      1200
cgttgctggc gtttttccat aggtcccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct      1260

```

ES 2 470 440 B1

```

caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa 1320
gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 1380
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtgt 1440
aggctcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 1500
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg 1560
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatatgt aggcggtgct acagagttct 1620
tgaagtgggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 1680
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 1740
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 1800
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggg ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 1860
aagggtattt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa 1920
aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat 1980
gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct 2040
gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggaggggctt accatctggc cccagtgtcg 2100
caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag 2160
ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgctccatc cagtctatta 2220
attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcg aacgttggtg 2280
ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttg tatggcttca ttcagctccg 2340
gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct 2400
ccttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcattggtta 2460
tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg 2520
gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc 2580
cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagt ctcattcattg 2640
gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga 2700
tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg 2760
ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaagg aataaggcg acacggaaat 2820
gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc 2880
tcattgagcgg atacatatctt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca 2940
catttccccg aaaagtgcc c 2961

```

<210> 22

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..35

<223> /mol_type="DNA"

/note="Cebador forward con sitio de restricción MunI para
amplificar el casete lacZ de pBluescript KS"

/organism="Artificial Sequence"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 7..12
 <223> /note="Sitio de restricción MunI"

 <400> 22
 cacacacaat tgtaacgctt acaatttcca ttcgc 35

 <210> 23
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <222> 1..33
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Cebador reverse con sitio de restricción NdeI para
 amplificar el casete lacZ de pBluescript KS"
 /organism="Artificial Sequence"

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 7..12
 <223> /note="Sitio de restricción NdeI"

 <400> 23
 cacacacata tggcgggcag tgagcgcaac gca 33

 <210> 24
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <222> 1..38
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Cebador forward para eliminar un sitio críptico de
 splicing de lacZ"
 /organism="Artificial Sequence"

 <400> 24
 cagcttttgt tcccttttgt gagggttaat tgcgcgct 38

 <210> 25
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <222> 1..38
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Cebador reverse para eliminar un sitio críptico de
 splicing de lacZ"
 /organism="Artificial Sequence"

 <400> 25
 agcgcgcaat taaccctcac aaaagggaac aaaagctg 38

 <210> 26
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

```

<220>
<221> source
<222> 1..42
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para fortalecer un sitio aceptor de
      splicing del segundo exon constitutivo de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 26
gggatattca ccattttctt ttcaggcctg gagatctccc ga 42

<210> 27
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..42
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para fortalecer un sitio aceptor de
      splicing del segundo exon constitutivo de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 27
tcgggagatc tccaggcctg aaaagaaaat ggtgaatatc cc 42

<210> 28
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..35
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para eliminar diana HindIII en posicion
      (340)..(345) de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 28
ctaggctttt gcaaaaaact tggactgtgt ttact 35

<210> 29
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..35
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para eliminar diana HindIII en posicion
      (340)..(345) de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 29
agtaaacaca gtccaagttt tttgcaaaag cctag 35

<210> 30
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..42

```

```

<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para eliminar diana HindIII en posicion
      (2618)..(2623) de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 30
gaaattaaca attacacaaa cttaatacac tccttaattg aa 42

<210> 31
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..42
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para eliminar diana HindIII en posicion
      (2618)..(2623) de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 31
ttcaattaag gagtgtatta agtttgtgta attgttaatt tc 42

<210> 32
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..37
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para eliminar una diana XbaI en posicion
      (679)..(684) de pSP3b y una diana SalI en posición (685)..(690)
      de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 32
tgacaagctg cagccctag aatcgaccca gcagtaa 37

<210> 33
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..37
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para eliminar una diana XbaI en posicion
      (679)..(684) de pSPL3b y una diana SalI en posición (685)..(690)
      de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 33
ttactgctgg gtcgattcta gggcgtgcag cttgtca 37

<210> 34
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..17
<223> /mol_type="DNA"

```

```

    /note="Secuencia consenso de sitio aceptor de splicing"
    /organism="Artificial Sequence"
<220>
<221> misc_feature
<222> 12
<223> /note="n se selecciona independientemente entre a, c, g o t"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"

<220>
<221> misc_feature
<222> 2
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"

<220>
<221> misc_feature
<222> 3
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"

<220>
<221> misc_feature
<222> 4
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"

<220>
<221> misc_feature
<222> 5
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"

<220>
<221> misc_feature
<222> 6
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"

<220>
<221> misc_feature
<222> 7
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"

<220>
<221> misc_feature
<222> 8
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"

<220>
<221> misc_feature
<222> 9
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"

<220>
<221> misc_feature
<222> 10

<220>
<221> misc_feature
<222> 11
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"

<220>
<221> misc_feature
<222> 17
<223> /note="b se selecciona independientemente entre c, g o t"

<400> 34
yyyyyyyyyyy yncaggb

```

ES 2 470 440 B1

<210> 35
 <211> 4589
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..4589
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Plásmido pSAD v1.0"
 /organism="Artificial Sequence"

```

<400> 35
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggg ttttgcaaaa agcttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaaggtag atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggaccc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag      600
tgaggggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa taccagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attctggagc     1020
tcgagcggcc gctgcaggat cccagatatc tgggtgatccc gtacctgtgt ggaaggaagc     1080
aaccaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat gatacagagg tacataatgt     1140
ttggggccaca catgccggtg taccacaga cccaaccca caagaagtag tattggtaaa     1200
tgtgacagaa aattttaaca tgtggaaaaa tgacatggta gaacagatgc atgaggatat     1260
aatcagttta tgggatcaaa gcctaaagcc atgtgtagga aaactacttt gcaccactgc     1320
tgtgccttgg aatgctagtt ggagtaataa atctctggaa cagatttgga atcacacgac     1380
ctggatggag tgggacagag aaattaacaa ttacacaagc ttaatacact ccttaattga     1440
agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga acaagaatta ttggaattag ataaatgggc     1500
aagtttgtgg aattggttta acataacaaa ttggctgtgg tatataaaat tattcataat     1560
gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat agtttttgct gtactttctg tagtgaatag     1620
agttaggcag ggatattcac cattatcggt tcagacctgg agatctcccg aggggacccg     1680
acaggccccg aggaatagaa gaagaagggtg gagagagaga cagagacaga tccattcgac     1740

```

ES 2 470 440 B1

caattcactc	ctcaggtgca	ggctgcctat	cagaaggtgg	tggctggtgt	ggccaatgcc	1800
ctggctcaca	aataccactg	agatccagac	atgataagat	acattgatga	gtttggacaa	1860
accacaacta	gaatgcagtg	aaaaaaatgc	tttattttgtg	aaattttgtga	tgctatttgct	1920
ttattttgtaa	ccattataag	ctgcaataaa	caagttaaca	acaacaattg	cattcattttt	1980
atgttttcagg	ttcaggggga	ggtgtgggag	gttttttaaa	gcaagtaaaa	cctctacaaa	2040
tgtggtatgg	ctgattatga	tccccaggaa	gctcctctgt	gtcctcataa	accctaacct	2100
cctctacttg	agaggacatt	ccaatcatag	gctgcccatac	caccctctgt	gtcctcctgt	2160
taattaggtc	acttaacaaa	aaggaaattg	ggtagggggtt	tttcacagac	cgcttttctaa	2220
gggtaattttt	aaaatatctg	ggaagtccct	tccactgctg	tgttccagaa	gtgttggttaa	2280
acagcccaca	aatgtcaaca	gcagaaacat	acaagctgtc	agctttgcac	aagggcccaa	2340
caccctgctc	atcaagaagc	actgtgggtt	ctgtgttagt	aatgtgcaaa	acaggaggca	2400
cattttcccc	acctgtgtag	gttccaaaat	atctagtgtt	ttcattttta	cttgatcag	2460
gaacccagca	ctccactgga	taagcattat	ccttatccaa	aacagccttg	tggtcagtgt	2520
tcactgctg	actgtcaact	gtagcatttt	ttgggggttac	agtttgagca	ggatatttg	2580
tcctgtagtt	tgctaacaca	ccccaggtgg	cacttttcgg	ggaaatgtgc	gcggaacccc	2640
tatttgttta	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	ctcatgagac	aataaccctg	2700
ataaatgctt	caataatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	attcaacatt	tccgtgtcgc	2760
ccttattccc	ttttttgcgg	cattttgcct	tcctgttttt	gctcaccag	aaacgctggt	2820
gaaagtaaaa	gatgctgaag	atcagttggg	tgcacgagtg	ggttacatcg	aactggatct	2880
caacagcggg	aagatccttg	agagttttcg	ccccgaagaa	cgttttccaa	tgatgagcac	2940
ttttaagtt	ctgctatgtg	gcgcggtatt	atccccgtatt	gacgccgggc	aagagcaact	3000
cggctgcccgc	atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	tactcaccag	tcacagaaaa	3060
gcatcttacg	gatggcatga	cagtaagaga	attatgcagt	gctgccataa	ccatgagtga	3120
taacactgcg	gccaaacttac	ttctgacaac	gatcggagga	ccgaatgagc	taaccgcttt	3180
tttgcacaa	atgggggatc	atgtaactcg	ccttgatcgt	tggaaccgg	agctgaatga	3240
agccatacca	aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctgta	gcaatggcaa	caacgttgcg	3300
caaactatta	actggcgaac	tacttactct	agcttcccgg	caacaattaa	tagactggat	3360
ggaggcggat	aaagttgcag	gaccacttct	gcgctcggcc	cttcgggctg	gctggtttat	3420
tgctgataaa	tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcgcggg	atcattgcag	cactggggcc	3480
agatggtaag	ccctcccgtg	tcgtagttat	ctacacgacg	gggagtcagg	caactatgga	3540
tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	tgcctcactg	attaagcatt	ggtaactgtc	3600
agaccaagtt	tactcatata	tacttttagat	tgatttaaaa	cttcattttt	aatttaaaag	3660
gatctaggtg	aagatccctt	ttgataatct	catgaccaa	atccttaacg	tgagttttcg	3720
ttccactgag	cgtcagaccc	cgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	tccttttttt	3780
ctgcgcgtaa	tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcggg	ggtttgtttg	3840
ccggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	gcttcagcag	agcgcagata	3900

ES 2 470 440 B1

```

ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca 3960
ccgcctacat acctcgtctt gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag 4020
tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc 4080
tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga 4140
tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagagaaa ggcggacagg 4200
tatccggtaa gcggcagggg cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc aggggggaaac 4260
gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg 4320
tgatgctcgt cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgggc ctttttacgg 4380
ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcttattc ccctgattct 4440
gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgccgcag ccgaacgacc 4500
gagcgcagcg agtcagtga cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgaa accgcctctc 4560
cccgcgcggt ggccgattca ttaatgcag 4589

```

```

<210> 36
<211> 4993
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..4993
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plasmid pSAD v2.0"
      /organism="Artificial Sequence"

```

```

<400> 36
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60
atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggcctccca 120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta 180
actccgcca tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300
tagtgaggag gctttttttg aggcctaggc ttttgcaaaa agcttggaact gtgtttactt 360
gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480
ggttgtctac ccatggaccc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa 540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctg ctgccttcag 600
tgagggctcg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca 660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tatcagcact 900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960

```

ES 2 470 440 B1

ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atggggtagg	gatcaccaga	attgtaacgc	1020
ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	gaagggcgat	cggtgcgggc	1080
ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	1140
aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	1200
cgactcacta	tagggcgaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtgg	1260
atcccccggg	ctgcaggaat	tcgatataca	gcttatcgat	accgtcgacc	tcgagggggg	1320
gcccgggtacc	cagcttttgt	tccctttagt	gaggggttaat	tgcgcgcttg	gcgtaatcat	1380
ggtcatagct	gtttcctgtg	tgaattgttt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	1440
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaatgagt	gagctaactc	acattaattg	1500
cgttgcgctc	actgcccgcc	atatgatata	gaggtacata	atgtttgggc	cacacatgcc	1560
gggtgtacca	cagaccccaa	cccacaagaa	gtagtattgg	taaatgtgac	agaaaatttt	1620
aacatgtgga	aaaatgacat	ggtagaacag	atgcatgagg	atataatcag	tttatgggat	1680
caaagcctaa	agccatgtgt	aggaaaacta	ctttgcacca	ctgctgtgcc	ttggaatgct	1740
agttggagta	ataaatctct	ggaacagatt	tggaatcaca	cgacctggat	ggagtggggac	1800
agagaaatta	acaattacac	aagcttaata	cactccttaa	ttgaagaatc	gcaaaaccag	1860
caagaaaaga	atgaacaaga	attattggaa	ttagataaat	gggcaagttt	gtggaattgg	1920
tttaacataa	caaattggct	gtggtatata	aaattattca	taatgatagt	aggaggcttg	1980
gtaggtttta	gaatagtttt	tgctgtactt	tctgtagtga	atagagttag	gcagggatat	2040
tcaccattat	cgtttcagac	ctggagatct	cccgagggga	cccgcagggc	ccgaagggaat	2100
agaagaagaa	gggtggagaga	gagacagaga	cagatccatt	cgaccaattc	actcctcagg	2160
tgcaggctgc	ctatcagaag	gtggtggctg	gtgtggccaa	tgccctggct	cacaaatacc	2220
actgagatcc	agacatgata	agatacattg	atgagtttgg	acaaaccaca	actagaatgc	2280
agtgaaaaaa	atgcttttatt	tgtgaaattt	gtgatgctat	tgctttattt	gtaaccatta	2340
taagctgcaa	taaacaagtt	aacaacaaca	attgcattca	ttttatgttt	caggttcagg	2400
gggagggtgtg	ggagggtttt	taaagcaagt	aaaacctcta	caaagtgtgt	atggctgatt	2460
atgatcccca	ggaagctcct	ctgtgtcctc	ataaacctta	acctcctcta	cttgagagga	2520
cattccaatc	ataggctgcc	catccaccct	ctgtgtcctc	ctgttaatta	ggtcacttaa	2580
caaaaaggaa	attgggtagg	ggtttttcac	agaccgcttt	ctaagggtaa	ttttaaaata	2640
tctgggaagt	cccttccact	gctgtgttcc	agaagtgttg	gtaaacagcc	cacaaatgtc	2700
aacagcagaa	acatacaagc	tgtcagcttt	gcacaagggc	ccaacaccct	gctcatcaag	2760
aagcactgtg	gttgctgtgt	tagtaatgtg	caaaacagga	ggcacatttt	ccccacctgt	2820
gtaggttcca	aaatatctag	tgttttcatt	tttacttgga	tcaggaaccc	agcactccac	2880
tggataagca	ttatccttat	ccaaaacagc	cttgtggtca	gtgttcatct	gctgactgtc	2940
aactgtagca	ttttttgggg	ttacagtttg	agcaggatat	ttggctcctgt	agtttgctaa	3000
cacaccccag	gtggcacttt	tcggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	3060
taaatacatt	caaatatgta	tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	3120

ES 2 470 440 B1

tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt	3180
gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct	3240
gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaaagatc	3300
cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta	3360
tgtggcgcggtg tattatccccg tattgacgcc gggcaagagc aactcgggtcg ccgcatacac	3420
tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc	3480
atgacagtaa gagaattatg cagtgtgccc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac	3540
ttactttctga caacgatcgg aggaccgaat gagctaaccg cttttttgca caacatgggg	3600
gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac	3660
gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc	3720
gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt	3780
gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctgggt ttattgctga taaatctgga	3840
gccggtgagc gtgggtctcg cggatatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc	3900
cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag	3960
atcgtcgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca	4020
tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc	4080
ctttttgata atctcatgac caaaatcctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag	4140
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct	4200
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtgggttg tttgccggat caagagctac	4260
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc	4320
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg	4380
ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt	4440
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt	4500
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc	4560
tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggatccg gtaagcggca	4620
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata	4680
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg	4740
ggcggagcct atggaaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct	4800
ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta	4860
ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag	4920
tgagcgagga agcggaagag cgccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga	4980
ttcattaatg cag	4993

<210> 37

<211> 4993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

ES 2 470 440 B1

<220>
 <221> source
 <222> 1..4993
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Plasmid pSAD v3.0"
 /organism="Artificial Sequence"

```
<400> 37
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggcctccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccggcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agcttgact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggaccc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctg ctgccttcag      600
tgaggggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa taccagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc     1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc     1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt      1140
aacgccaggg ttttcccagt cagcagcttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata     1200
cgactcacta tagggcgaaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg     1260
atcccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg     1320
gcccggtagc cagcttttgt tcccttttgt gagggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat     1380
ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag     1440
ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaattgagt gagctaactc acattaattg     1500
cgttgcgctc actgcccgcc atatgatata gaggtacata atgtttgggc cacacatgcc     1560
ggtgtacca cagaccccaa cccacaagaa gtagtattgg taaatgtgac agaaaatttt     1620
aacatgtgga aaaatgacat ggtagaacag atgcatgagg atataatcag tttatgggat     1680
caaagcctaa agccatgtgt aggaaaaacta ctttgacca ctgctgtgcc ttggaatgct     1740
agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaatcaca cgacctggat ggagtgggac     1800
agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc gaaaaccag     1860
caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt gtggaattgg     1920
```

ES 2 470 440 B1

tttaacataa	caaattggct	gtggtatata	aaattattca	taatgatagt	aggaggcttg	1980
gtaggtttta	gaatagtttt	tgctgtactt	tctgtagtga	atagagttag	gcagggatat	2040
tcaccattat	cgtttcagac	ctggagatct	cccgagggga	cccacaggc	ccgaaggaat	2100
agaagaagaa	ggtggagaga	gagacagaga	cagatccatt	cgaccaattc	actcctcagg	2160
tgcaggctgc	ctatcagaag	gtggtggctg	gtgtggccaa	tgccctggct	cacaaatacc	2220
actgagatcc	agacatgata	agatacattg	atgagtttgg	acaaaccaca	actagaatgc	2280
agtgaaaaaa	atgctttatt	tgtgaaattt	gtgatgctat	tgctttattt	gtaaccatta	2340
taagctgcaa	taaacaagtt	aacaacaaca	attgcattca	ttttatgttt	cagggttcagg	2400
gggagggtgtg	ggagggtttt	taaagcaagt	aaaacctcta	caaagtgtgt	atggctgatt	2460
atgatcccca	ggaagctcct	ctgtgtcctc	ataaacctta	acctcctcta	cttgagagga	2520
cattccaatc	ataggctgcc	catccaccct	ctgtgtcctc	ctgttaatta	ggtcacttaa	2580
caaaaaggaa	attgggtagg	ggtttttcac	agaccgcttt	ctaagggtaa	ttttaaaata	2640
tctgggaagt	cccttccact	gctgtgttcc	agaagtgttg	gtaaacagcc	cacaaatgtc	2700
aacagcagaa	acatacaagc	tgtcagcttt	gcacaagggc	ccaacaccct	gctcatcaag	2760
aagcactgtg	gttgctgtgt	tagtaatgtg	caaaacagga	ggcacatttt	ccccacctgt	2820
gtaggttcca	aaatatctag	tgttttcatt	tttacttggg	tcaggaaccc	agcactccac	2880
tggataagca	ttatccttat	ccaaaacagc	cttggtgtca	gtgttcatct	gctgactgtc	2940
aactgtagca	ttttttgggg	ttacagtttg	agcaggatat	ttggtcctgt	agtttgctaa	3000
cacaccccag	gtggcacttt	tcgggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	3060
taaatacatt	caaatatgta	tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	3120
tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttttt	3180
gcggcatttt	gccttcctgt	ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	3240
gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	3300
cttgagagtt	ttcgccccga	agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	3360
tgtggcgcg	tattatcccc	tattgacgcc	gggcaagagc	aactcggtcg	ccgcatacac	3420
tattctcaga	atgacttggg	tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	3480
atgacagtaa	gagaatttat	cagtgtctgc	ataaccatga	gtgataacac	tgcggccaac	3540
ttactttctga	caacgatcgg	aggaccgaat	gagctaaccg	cttttttgca	caacatgggg	3600
gatcatgtaa	ctcgccttga	tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	3660
gagcgtgaca	ccacgatgcc	tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	3720
gaactactta	ctctagcttc	ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	3780
gcaggaccac	ttctgcgctc	ggcccttccg	gctggctggg	ttattgctga	taaatctgga	3840
gccggtgagc	gtgggtctcg	cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	3900
cgtatcgtag	ttatctacac	gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	3960
atcgctgaga	taggtgcctc	actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	4020

ES 2 470 440 B1

tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc	4080
ctttttgata atctcatgac caaaatcctt aacgtgagtt ttcgttcac tgagcgtcag	4140
accccgtaga aaagatcaaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgctg gtaatctgct	4200
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggtttg tttgccggat caagagctac	4260
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc	4320
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg	4380
ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt	4440
tggactcaag acgatatgta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt	4500
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc	4560
tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca	4620
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata	4680
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg	4740
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct	4800
ggccttttgc tcacatgttc tttcctgctg tatccccctga ttctgtggat aaccgtatta	4860
ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag	4920
tgagcgagga agcgggaagag cgccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga	4980
ttcattaatg cag	4993

```

<210> 38
<211> 4993
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..4993
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plasmid pSAD v4.0"
      /organism="Artificial Sequence"

```

<400> 38	
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt	60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca	120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta	180
actccgcca tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga	240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag	300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt	360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac	420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct	480
ggttgtctac ccatggaccc agagggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa	540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag	600
tgagggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca	660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc	720

ES 2 470 440 B1

tatacaaata	gcaatagtag	cattagtagt	agcaataata	atagcaatag	ttgtgtggtc	780
catagtaatc	atagaatata	ggaaaaatatt	aagacaaaga	aaaatagaca	ggttaattga	840
tagactaata	gaaagagcag	aagacagtgg	caatgagagt	gaaggagaaa	tatcagcact	900
tgtggagatg	ggggtggaga	tggggcacca	tgctccttgg	gatgttgatg	atctgtagtg	960
ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atggggtagg	gatcaccaga	attgtaacgc	1020
ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	gaagggcgat	cgggtgcgggc	1080
ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	1140
aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	1200
cgactcacta	tagggcgaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtgg	1260
atcccccggg	ctgcaggaat	tcgatatcaa	gcttatcgat	accgtcgacc	tcgagggggg	1320
gccccgtacc	cagcttttgt	tcccttttgt	gagggttaat	tgcgcgcttg	gcgtaatcat	1380
ggtcatagct	gtttcctgtg	tgaaattgtt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	1440
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaattgagt	gagctaactc	acattaattg	1500
cgttgcgctc	actgcccgcc	atatgataca	gaggtagata	atgtttgggc	cacacatgcc	1560
gggtgtacca	cagaccccaa	cccacaagaa	gtagtattgg	taaatgtgac	agaaaatttt	1620
aacatgtgga	aaaatgacat	ggtagaacag	atgcatgagg	atataatcag	tttatgggat	1680
caaagcctaa	agccatgtgt	aggaaaaacta	ctttgcacca	ctgctgtgcc	ttggaatgct	1740
agttggagta	ataaatctct	ggaacagatt	tggaatcaca	cgacctggat	ggagtgggac	1800
agagaaatta	acaattacac	aaacttaata	cactccttaa	ttgaagaatc	gcaaaaccag	1860
caagaaaaga	atgaacaaga	attattggaa	ttagataaat	gggcaagttt	gtggaattgg	1920
tttaacataa	caaattggct	gtggtatata	aaattattca	taatgatagt	aggaggcttg	1980
gtaggtttta	gaatagtttt	tgctgtactt	tctgtagtga	atagagttag	gcagggatat	2040
tcaccattat	cgtttcagac	ctggagatct	cccaggggga	cccacaggc	ccgaagggaat	2100
agaagaagaa	ggtggagaga	gagacagaga	cagatccatt	cgaccaattc	actcctcagg	2160
tgcaggctgc	ctatcagaag	gtggtggctg	gtgtggccaa	tgccctggct	cacaaatacc	2220
actgagatcc	agacatgata	agatacattg	atgagtttgg	acaaaccaca	actagaatgc	2280
agtgaaaaaa	atgcttttatt	tgtgaaattt	gtgatgctat	tgctttattt	gtaaccatta	2340
taagctgcaa	taaacaagtt	aacaacaaca	attgcattca	ttttatgttt	caggttcagg	2400
gggaggtgtg	ggaggttttt	taaagcaagt	aaaacctcta	caaatgtggt	atggctgatt	2460
atgatcccca	ggaagctcct	ctgtgtcctc	ataaacctta	acctcctcta	cttgagagga	2520
cattccaatc	ataggctgcc	catccaccct	ctgtgtcctc	ctgttaatta	ggtcacttaa	2580
caaaaaggaa	attgggtagg	ggtttttcac	agaccgcttt	ctaagggtaa	ttttaaaata	2640
tctgggaagt	cccttcact	gctgtgttcc	agaagtgttg	gtaaacagcc	cacaaatgtc	2700
aacagcagaa	acatacaagc	tgtcagcttt	gcacaagggc	ccaacaccct	gctcatcaag	2760
aagcactgtg	gttgctgtgt	tagtaatgtg	caaaacagga	ggcacatttt	ccccacctgt	2820

ES 2 470 440 B1

gtaggttcca	aaatatctag	tgttttcatt	tttacttgga	tcaggaaccc	agcactccac	2880
tggataagca	ttatccttat	ccaaaacagc	cttgtggtca	gtgttcatct	gctgactgtc	2940
aactgtagca	ttttttgggg	ttacagtttg	agcaggatat	ttggtcctgt	agtttgctaa	3000
cacacccccag	gtggcacttt	tcgggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatattg	tttatttttc	3060
taaatacatt	caaatatgta	tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	3120
tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttttt	3180
gcggcatttt	gccttcctgt	ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	3240
gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	3300
cttgagagtt	ttcgccccga	agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	3360
tgtggcgcgg	tattatccccg	tattgacgcc	gggcaagagc	aactcggtcg	ccgcatacac	3420
tattctcaga	atgacttggg	tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	3480
atgacagtaa	gagaattatg	cagtgtctgcc	ataaccatga	gtgataacac	tgcggccaac	3540
ttacttctga	caacgatcgg	aggaccgaat	gagctaaccg	cttttttgca	caacatgggg	3600
gatcatgtaa	ctcgccttga	tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	3660
gagcgtgaca	ccacgatgcc	tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	3720
gaactactta	ctctagcttc	ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	3780
gcaggaccac	ttctgcgctc	ggcccttcgg	gctggctggg	ttattgctga	taaatctgga	3840
gccggtgagc	gtgggtctcg	cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	3900
cgtatcgtag	ttatctacac	gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	3960
atcgctgaga	taggtgcctc	actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	4020
tatatacttt	agattgattt	aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	4080
ctttttgata	atctcatgac	caaaatcctt	aacgtgagtt	ttcgttccac	tgagcgtcag	4140
acccccgtaga	aaagatcaaa	ggatcttctt	gagatccttt	ttttctgcgc	gtaatctgct	4200
gcttgcaaac	aaaaaaacca	ccgctaccag	cggtgggttg	tttgccggat	caagagctac	4260
caactctttt	tccgaaggta	actggcttca	gcagagcgca	gataccaaat	actgttcttc	4320
tagtgtagcc	gtagttaggc	caccacttca	agaactctgt	agcaccgcct	acatacctcg	4380
ctctgcta	cctgttacca	gtggctgctg	ccagtggcga	taagtcgtgt	cttaccgggt	4440
tggactcaag	acgatagtta	ccggataagg	cgagcggtc	gggctgaacg	gggggttcgt	4500
gcacacagcc	cagcttggag	cgaacgacct	acaccgaact	gagataccta	cagcgtgagc	4560
tatgagaaaag	cgccacgctt	cccgaaggga	gaaaggcgga	caggatatccg	gtaagcggca	4620
gggtcggaac	aggagagcgc	acgagggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	tatctttata	4680
gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	agcgtcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	4740
ggcggagcct	atggaaaaaac	gccagcaacg	cggccttttt	acggttcctg	gccttttgct	4800
ggcctttttgc	tcacatgttc	tttctgctg	tatcccctga	ttctgtggat	aaccgtatta	4860
ccgcctttga	gtgagctgat	accgctcgcc	gcagccgaac	gaccgagcgc	agcgagtcag	4920
tgagcgagga	agcggaagag	cgcccaatac	gcaaaccgcc	tctccccgcg	cgttggccga	4980

ttcattaatg cag 4993

<210> 39
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..34
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Cebador forward para amplificar los exones 21, 22, 23 y 24
 y secuencias intrónicas del gen BRCA2"
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 39
 cacacactcg agccttcttt gggtgtttta tgct 34

<210> 40
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..34
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Cebador reverse para amplificar los exones 21, 22, 23 y 24
 y secuencias intrónicas del gen BRCA2"
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 40
 cacacaggat ccaaatacaga ggttcaaaga ggct 34

<210> 41
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..50
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Cebador forward para delección de 2.000 pb del intrón 21
 del gen BRCA2"
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 41
 ttaaaatgca ggcaaaactt gtttttagcc atctgtaatg tagttggtga 50

<210> 42
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..50
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Cebador reverse para delección de 2.000 pb del intrón 21
 del gen BRCA2"
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 42
 tcaccaacta cattacagat ggctaaaaac aagttttgcc tgcattttaa 50

<210> 43
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <222> 1..47
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Cebador forward para amplificar los exones 19 y 20 y
 secuencias intrónicas del gen BRCA2"
 /organism="Artificial Sequence"

 <400> 43
 tctggagctc gagcacacat ccggaatagc attaagaact tntagca 47

 <210> 44
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <222> 1..47
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Cebador reverse para amplificar los exones 19 y 20 y
 secuencias intrónicas del gen BRCA2"
 /organism="Artificial Sequence"

 <400> 44
 ccaagcataa aacacccaaa gaaggattac aaatggctta gacctga 47

 <210> 45
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <222> 1..46
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Cebador forward para amplificar el inserto de
 MGBR2_EX19-24-pSPL3b"
 /organism="Artificial Sequence"

 <400> 45
 cacacactcg agcacacatc cggaatagca ttaagaactt gtagca 46

 <210> 46
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <222> 1..46
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Cebador reverse para amplificar el inserto de
 MGBR2_EX19-24-pSPL3b"
 /organism="Artificial Sequence"

 <400> 46
 cacacaggat cccacacagg taccaaatca gaggttcaaa gaggct 46

 <210> 47
 <211> 47


```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..47
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar el exón 25 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 47
gtaagcctct ttgaacctct gatttaatct gtactcctgt tagcaat
47

<210> 48
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..47
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar el exón 25 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 48
caaaagggaa caaaagctgg gtacctcagt gtctcttatc tgggatt
47

<210> 49
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar el exón 26 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 49
cacacaggta ccagtaaata gagctaggac ttga
34

<210> 50
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar el exón 26 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 50
cacacaggta ccttgatttg catctactgt gatt
34

<210> 51
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..50
<223> /mol_type="DNA"

```

```

    /note="Cebador forward para amplificar el exón 27 del gen BRCA2"
    /organism="Artificial Sequence"

<400> 51
ccagcttttg ttcccttttg tgagggtctt ccttcctttt catgtcattt          50

<210> 52
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..50
<223> /mol_type="DNA"
    /note="Cebador reverse para amplificar el exón 27 del gen BRCA2"
    /organism="Artificial Sequence"

<400> 52
atctgtctct gtctctctct ccaccttaat ttcttttctc attgtgcaac          50

<210> 53
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
    /note="Cebador forward para amplificar los exones 25 y 26 del gen
    BRCA2"
    /organism="Artificial Sequence"

<400> 53
cacacaggat cctatacctg cttccacatg acct                              34

<210> 54
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
    /note="Cebador reverse para amplificar los exones 25 y 26 del gen
    BRCA2"
    /organism="Artificial Sequence"

<400> 54
cacacactcg aggccacata acaaccacat tttc                              34

<210> 55
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
    /note="Cebador forward para amplificar el exon 10 del gen BRCA2"
    /organism="Artificial Sequence"

<400> 55
cacacactgc agacacaaaa acaaagccta ttga                              34

```

```

<210> 56
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar el exon 10 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 56
cacacactcg agaagagtga tggatataca caaa                                     34

<210> 57
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..35
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar los exones 4, 5, 6 y 7 del
      gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 57
cacacagaat tctctggtac attggtaggt tttca                                     35

<210> 58
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar los exones 4, 5, 6 y 7 del
      gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 58
cacacactcg agccaaatac tgcctcttaa acgc                                     34

<210> 59
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..58
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar el exon 3 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 59
cacacagaat tccacacatc cggacacaca ttcgaagcca tcttgtaact tttgtgaa       58

<210> 60
<211> 34
<212> DNA

```

```

<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar el exon 3 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 60
cacacagaat tcttggcata agaaagacgt aatt                                     34

<210> 61
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..35
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar el exon 8 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 61
cacacactcg aggtcataac ctcacagcat catct                                     35

<210> 62
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..46
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar el exon 8 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 62
cacacaggta cccacacaaa gcttcaactt taacagagag acagca                       46

<210> 63
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar el exon 9 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 63
cacacaaagc tttcctagtg gtgcaagatt tcat                                     34

<210> 64
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar el exon 9 del gen BRCA2"

```

```

/organism="Artificial Sequence"

<400> 64
cacacaggta cctggtgccca attaaaaaga gtag
34

<210> 65
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..36
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar el exon 2 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 65
cacacacggc cggaaactaa atcgtatgaa aatcct
36

<210> 66
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar el exon 2 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 66
cacacatccg gataagctac ataaacaaaa gcac
34

<210> 67
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..49
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar los exones 17 y 18 del gen
      BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 67
gctctagaac tagtggatcc cccggtcagt atgatacttt gatacatgt
49

<210> 68
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..46
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar los exones 17 y 18 del gen
      BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 68
ataagcttga tatcgaattc ctgcagtgga atagggatct gatcaa
46

```

```

<210> 69
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..47
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar el exon 16 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 69
gctctagaac tagtggatcc cccggccctt ttgtttccca tctaagt
47

<210> 70
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..46
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar el exon 16 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 70
gacatgtatc aaagtatcat actgaataaa tgcctaagaa aaatgt
46

<210> 71
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar los exones 19 y 20 del gen
      BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 71
cacacactcg agatagcatt aagaacttgt agca
34

<210> 72
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar los exones 19 y 20 del gen
      BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 72
cacacaggta ccattacaaa tggcttagac ctga
34

<210> 73
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..50
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para delección de la secuencia del MCS de
      pSAD v5.0 entre los insertos de los exones 18 y 19 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 73
tgctttgatc agatccctat tccacatagc attaagaact tgtagcagta          50

<210> 74
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..50
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para delección de la secuencia del MCS de
      pSAD v5.0 entre los insertos de los exones 18 y 19 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 74
tactgctaca agttcttaat gctatgtgga atagggatct gatcaaagca          50

<210> 75
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward del exon constitutivo 1 del vector pSAD"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 75
tcacctggac aacctcaaag          20

<210> 76
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse del exon constitutivo 2 del vector pSAD"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 76
tgaggagtga attggtcgaa          20

<210> 77
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"

```

```

    /note="Cebador RT_SD6-FW"
    /organism="Artificial Sequence"

<400> 77
tctgagtcac ctggacaacc                                     20

<210> 78
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..21
<223> /mol_type="DNA"
    /note="Cebador RT_SA2-RV"
    /organism="Artificial Sequence"

<400> 78
atctcagtgg tatttgtgag c                                     21

<210> 79
<211> 4993
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..4993
<223> /mol_type="DNA"
    /note="Secuencia general de los plásmidos pSAD v5.0 y pSAD v6.0"
    /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 679
<223> /note="n se selecciona independientemente entre t o c"

<220>
<221> misc_feature
<222> 685
<223> /note="n se selecciona independientemente entre g o a"

<400> 79
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtcaccag gtcaccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggcctccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggaccc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag      600
tgaggggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgcnc tagantcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780

```


ES 2 470 440 B1

catagtaatc	atagaatata	ggaaaaatatt	aagacaaaga	aaaatagaca	ggttaattga	840
tagactaata	gaaagagcag	aagacagtgg	caatgagagt	gaaggagaaa	tatcagcact	900
tgtggagatg	gggggtggaga	tggggcacca	tgctccttgg	gatgttgatg	atctgtagtg	960
ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atggggtagg	gatcaccaga	attgtaacgc	1020
ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	gaagggcgat	cgggtgctggc	1080
ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	1140
aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	1200
cgactcacta	tagggcggaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtgg	1260
atcccccggg	ctgcaggaat	tcgatatcaa	gcttatcgat	accgtcgacc	tcgagggggg	1320
gccccgtacc	cagcttttgt	tcccttttgt	gagggttaat	tgcgcgcttg	gcgtaatcat	1380
ggtcatagct	gtttcctgtg	tgaaattggt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	1440
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaatgagt	gagctaactc	acattaattg	1500
cgttgcgctc	actgcccgcc	atatgatata	gaggtagata	atgtttgggc	cacacatgcc	1560
ggtgtaccca	cagaccccaa	cccacaagaa	gtagtatttg	taaatgtgac	agaaaatttt	1620
aacatgtgga	aaaatgacat	ggtagaacag	atgcatgagg	atataatcag	tttatgggat	1680
caaagcctaa	agccatgtgt	aggaaaaacta	ctttgcacca	ctgctgtgcc	ttggaatgct	1740
agttggagta	ataaatctct	ggaacagatt	tggaaatcaca	cgacctggat	ggagtgggac	1800
agagaaatta	acaattacac	aaacttaata	cactccttaa	ttgaagaatc	gcaaaaccag	1860
caagaaaaga	atgaacaaga	attattggaa	ttagataaat	gggcaagttt	gtggaattgg	1920
tttaacataa	caaattggct	gtggtatata	aaattattca	taatgatagt	aggaggcttg	1980
gtaggtttta	gaatagtttt	tgctgtactt	tctgtagtga	atagagttag	gcagggatat	2040
tcaccatttt	cttttcaggc	ctggagatct	cccgagggga	cccgcaggc	ccgaaggaat	2100
agaagaagaa	ggtggagaga	gagacagaga	cagatccatt	cgaccaattc	actcctcagg	2160
tgagggtgct	ctatcagaag	gtggtggctg	gtgtggccaa	tgccctggct	cacaaatacc	2220
actgagatcc	agacatgata	agatacattg	atgagtttgg	acaaaccaca	actagaatgc	2280
agtgaaaaaa	atgctttatt	tgtgaaattt	gtgatgctat	tgctttattt	gtaaccatta	2340
taagctgcaa	taaacaagtt	aacaacaaca	attgcattca	ttttatgttt	cagggttcagg	2400
gggagggtgtg	ggagggttttt	taaagcaagt	aaaacctcta	caaatgtggg	atggctgatt	2460
atgatcccca	ggaagctcct	ctgtgtcctc	ataaacctta	acctcctcta	cttgagagga	2520
cattccaatc	ataggctgcc	catccaccct	ctgtgtcctc	ctgttaatta	ggtcacttaa	2580
caaaaaggaa	attgggtagg	ggtttttcac	agaccgcttt	ctaagggtaa	ttttaaaata	2640
tctgggaagt	cccttccact	gctgtgttcc	agaagtgttg	gtaaacagcc	cacaaatgtc	2700
aacagcagaa	acatacaagc	tgtcagcttt	gcacaagggc	ccaacaccct	gctcatcaag	2760
aagcactgtg	gttgctgtgt	tagtaatgtg	caaaacagga	ggcacatttt	ccccacctgt	2820
gtaggttcca	aaatatctag	tgttttcatt	tttacttggg	tcaggaaccc	agcactccac	2880

ES 2 470 440 B1

tggataagca	ttatccttat	ccaaaacagc	cttgtggtca	gtgttcatct	gctgactgtc	2940
aactgtagca	ttttttgggg	ttacagtttg	agcaggatat	ttggtcctgt	agtttgctaa	3000
cacaccccag	gtggcacttt	tcggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	3060
taaatacatt	caaatatgta	tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	3120
tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttttt	3180
gcggcatttt	gccttcctgt	ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	3240
gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	3300
cttgagagtt	ttcgccccga	agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	3360
tgtggcgcg	tattatcccc	tattgacgcc	gggcaagagc	aactcggtcg	ccgcatacac	3420
tattctcaga	atgacttggg	tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	3480
atgacagtaa	gagaatttat	cagtgtctgc	ataaccatga	gtgataacac	tgcgccaac	3540
ttactttctga	caacgatcgg	aggaccgaat	gagctaaccg	cttttttgca	caacatgggg	3600
gatcatgtaa	ctcgccttga	tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	3660
gagcgtgaca	ccacgatgcc	tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	3720
gaactactta	ctctagcttc	ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	3780
gcaggaccac	ttctgcgctc	ggcccttccg	gctggctggg	ttattgctga	taaatctgga	3840
gccggtgagc	gtgggtctcg	cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	3900
cgtatcgtag	ttatctacac	gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aatagacag	3960
atcgctgaga	taggtgcctc	actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	4020
tatatacttt	agattgattt	aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	4080
ctttttgata	atctcatgac	caaaatcctt	aacgtgagtt	ttcgttccac	tgagcgtcag	4140
accccgtaga	aaagatcaaa	ggatcttctt	gagatccttt	ttttctgcgc	gtaatctgct	4200
gcttgcaaac	aaaaaaacca	ccgctaccag	cgggtggttg	tttgccggat	caagagctac	4260
caactctttt	tccgaaggta	actggcttca	gcagagcgca	gataccaaat	actgttcttc	4320
tagtgtagcc	gtagttaggc	caccacttca	agaactctgt	agcaccgcct	acatacctcg	4380
ctctgcta	cctgttacca	gtggctgctg	ccagtggcga	taagtcgtgt	cttaccgggt	4440
tggactcaag	acgatagtta	ccggataagg	cgagcggtc	gggctgaacg	gggggttcgt	4500
gcacacagcc	cagcttggag	cgaacgacct	acaccgaact	gagataccta	cagcgtgagc	4560
tatgagaaa	cgccacgctt	cccgaaggga	gaaaggcgga	caggatatccg	gtaagcggca	4620
gggtcggaac	aggagagcgc	acgagggagc	ttccaggggg	aaacgcctgg	tatctttata	4680
gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	agcgtcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	4740
ggcggagcct	atggaaaaac	gccagcaacg	cggccttttt	acggttcctg	gccttttgct	4800
ggcctttttg	tcacatgttc	tttcctgcgt	tatcccctga	ttctgtggat	aaccgtatta	4860
ccgcctttga	gtgagctgat	accgctcgcc	gcagccgaac	gaccgagcgc	agcgagtcag	4920
tgagcgagga	agcgggaagag	cgccaataac	gcaaaccgcc	tctccccgcg	cgttggccga	4980
ttcattaatg	cag					4993

```

<210> 80
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..19
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward 2 del exon constitutivo 1 del vector pSAD"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 80
tgctaagctg agtgaactg 19

<210> 81
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..19
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse 2 del exon constitutivo 2 del vector pSAD"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 81
ggagtgaatt ggtcgaatg 19

<210> 82
<211> 9493
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..9493
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSPL3b clonado con exones 21, 22, 23 y 24 y
      secuencias flanqueantes de los intrones 20, 21, 22, 23 y 24 del
      gen BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..9493
<223> /note="Minigen pSPL3b-MGBR2_EX21-24"

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1026,4739..9493)
<223> /note="Plásmido pSPL3b"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1027..4738
<223> /note="Exones 21, 22, 23 y 24 y secuencias flanqueantes de los
      intrones 20, 21, 22, 23 y 24 del gen BRCA2"

<400> 82
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtcgccag gtcgccagc aggcagaagt 60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcgcc aggcctccca 120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgcccta 180

```

ES 2 470 440 B1

actccgcca	tcccgccct	aactccgcc	agttccgcc	attctccgcc	ccatggctga	240
ctaattttt	ttatttatgc	agaggccgag	gccgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	300
tagtgaggag	gcttttttg	aggcctaggc	ttttgcaaaa	agcttggact	gtgtttactt	360
gcaatcccc	aaaacagaca	gaatggtgca	tctgtccagt	gaggagaagt	ctgcggtcac	420
tgccctgtgg	ggcaagggtga	atgtggaaga	agttggtggt	gaggccctgg	gcaggctgct	480
ggttgcttac	ccatggaccc	agaggttctt	cgagtccttt	ggggacctgt	cctctgcaaa	540
tgctgttatg	aacaatccta	aggtgaaggc	tcatggcaag	aaggtgctgg	ctgccttcag	600
tgagggctctg	agtcacctgg	acaacctcaa	aggcaccttt	gctaagctga	gtgaactgca	660
ctgtgacaag	ctgcacgctc	tagagtcgac	ccagcagtaa	gtaatacatg	taatgcaacc	720
tatacaaata	gcaatagtag	cattagtagt	agcaataata	atagcaatag	ttgtgtggtc	780
catagtaatc	atagaatata	ggaaaatatt	aagacaaaga	aaaatagaca	ggttaattga	840
tagactaata	gaaagagcag	aagacagtgg	caatgagagt	gaaggagaaa	tatcagcact	900
tgtggagatg	ggggtggaga	tggggcacca	tgctccttgg	gatgttgatg	atctgtagtg	960
ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atgggggtacg	ggatcaccag	aattctggag	1020
ctcgagcctt	ctttgggtgt	tttatgcttg	gttcttttagt	tttagttgct	tttgaattta	1080
cagtttagtg	aattaataat	ccttttgttt	tcttagaaaa	cacaacaaaa	ccatatttac	1140
catcacgtgc	actaacaaga	cagcaagttc	gtgctttgca	agatggtgca	gagctttatg	1200
aagcagtga	gaatgcagca	gaccagctt	accttgaggt	gagagagtaa	gaggacatat	1260
aatgaggctt	gatgattatt	caagggtgaga	agctgtttta	gactctctgg	ccatcacagg	1320
aaggagtatg	ttgaaatgct	gcatttctca	aaagggatgt	gtacatttct	gggattttca	1380
gtgatgtgcc	agacgagtgt	ggtggtatgt	tttcaactat	ataccgagta	gaggatggga	1440
gggttctaga	attttatata	ttaattaaat	ttgggtttaa	atgcaggcaa	aacttgtttt	1500
atttttgtcc	ctcctgtact	ctgaagcaaa	aaaacttttt	tatttttaag	ataaaacaaa	1560
tatcttcaaa	gtaatggctt	agtttccatg	ttcttagctg	tttctcaagt	ccttcctgga	1620
gtgtacttga	taatcctcta	ccctaagggt	acttgggtag	aaatgtttcc	gaagcactaa	1680
actgttagaa	gtagcatagg	ctttagaatc	gtggcactct	cattttatta	gcaaagtaaa	1740
tgacaataaa	atagctggcc	aggcgcggtg	gctcacgcct	ataatcccag	cactttggga	1800
gaccgaggca	gaaggatcac	ctgaggtcgg	gagttcgtga	ccagcctggc	caacgtggtg	1860
aaaccccgtc	cctattaaaa	atacaaaatt	agccaggcgt	ggtgcacatg	cctgtaatcc	1920
cagctgttcg	ggaggctcag	gcaggagaat	cgcttgaatc	caggaggcag	aggttgcagt	1980
gagccaaggt	catgccattg	cactccagcc	taggcaacaa	gagcaaaact	ccgtctcaaa	2040
aaaaaaaaa	aaagctatta	aatgggcgta	aatgtttgtt	ttaggatcaa	ataaataatc	2100
tatataaaag	ttccatataa	atgttagtta	ctattattag	aacataattt	tatatattaa	2160
actacctcct	aaattttttag	acaggtagat	agctaaaaaa	aaattcaaat	tctaagatta	2220
gtttgttagg	gaggaaggag	caaatatatt	acaaaaacta	cttgttttta	attgattaat	2280
ttcattcact	tgatgactta	gtaaatcttg	tgaatatagc	cttaaatttc	ttaaatagtg	2340

ES 2 470 440 B1

ggactacaaa	ataaacaata	tttcatcagt	aatgtaagca	gtgctatact	gagtagaatt	2400
ccctcctggt	ccgaaatggt	acaatttggg	ttctccctgt	gagaagtgag	tccggtttta	2460
aaacctgtga	gtatacttgc	tgcaggctctg	aaaatgaagg	ctttatgatt	ctttcttgaa	2520
aaattatttg	cctctatctt	ttataatatt	atttggtgaa	gcttggtgat	tctatgaatc	2580
atcatgaaga	tagctttaat	ttcatccaca	aaatttaaca	atattttttt	gtctggacat	2640
aagggggcag	aataagagtt	ggagtagggc	cttgcccagc	cactctgtaa	ctggacaagt	2700
gatgtattta	tttcttagga	cctcatttcc	accttctatc	aagggaaaac	ctaagagtag	2760
gttatcttta	gggttctaag	tgcctatgag	tctatgagat	ttgactttat	taaagttatc	2820
tttgtaattc	tttgaggaga	acgtaggcat	ccatttttaa	aacagtcctg	ttagaatttg	2880
ttttcagtaa	caatgttgaa	tgatggcctt	ttgaaatcag	gttttacaac	aaaattgttt	2940
aaacactgcc	tgcataattt	gaatctctat	acctatatta	agatacagag	attggatagt	3000
ctcccttttc	agtatagata	atctcccttc	ccggtagaga	ttaggatatt	aagatgtata	3060
atatcctaaa	gtgtagcagc	agtctgggat	gttacatgtc	taaattccat	ttcctatttt	3120
atttgtttat	tgattttatc	gtttattttt	gttacctgg	gtaagattcc	caagaggtac	3180
aagtagaaat	ttgctaaagt	gagtaggaca	gaagtgtaga	ggcaaacata	aaagtatggt	3240
tagtacatat	ctgtttttaa	ttgtatctac	tatttcaaag	ttaatggaat	tatactcctg	3300
gggctaagaa	tgaggggttct	agggccaacc	tctactacct	atgtggcttg	tgcaaattag	3360
ttgtccccct	tgtgcctcag	ttttacctac	aacacagaaa	caatgatatt	acctaccca	3420
tggactgttg	tgaagattaa	atgaattagt	acatttacta	cacatagatc	tattttctcaa	3480
aataatgagc	attcagatat	tagccatctg	taatgtagtt	ggtgatgatt	atgattatta	3540
gagtacattt	ataattggag	gatcattttt	gccgtaggga	aatagaatta	ttaatagttt	3600
gaggcacctg	agaatattat	gtgagaaaact	gattacatta	accacaccct	taagatgagc	3660
tctaattttg	ttgtattttg	cctgttttaa	gccatctagt	tacaatagat	ggaacttttt	3720
tgttctgatt	gctttttatt	ccaatatctt	aaatggtcac	agggttattt	cagtgaagag	3780
cagttaagag	ccttgaataa	tcacaggcaa	atgttgaatg	ataagaaaca	agctcagatc	3840
cagttggaaa	ttaggaaggc	catggaatct	gctgaacaaa	aggaacaagg	tttatcaagg	3900
gatgtcacaa	ccgtgtggaa	gttgcgtatt	gtaagctatt	caaaaaaaga	aaaagattca	3960
ggtaagtatg	taaatgcttt	gtttttatca	gttttattaa	cttaaaaaat	gaccttacta	4020
acaaaatgat	tataaatcca	gataaagtat	aaagttagtt	tatatcagag	aagcaaaatc	4080
cactactaat	gcccacaaa	agataatata	aaagaggatc	tgtattttatt	ttgaaacaaa	4140
catttaaatg	ataatcactt	cttccattgc	atctttctca	tctttctcca	aacagttata	4200
ctgagtattt	ggcgtccatc	atcagattta	tattctctgt	taacagaagg	aaagagatac	4260
agaatttatc	atcttgcaac	ttcaaaatct	aaaagtaa	ctgaaagagc	taacatacag	4320
ttagcagcga	caaaaaaaac	tcagtatcaa	caactaccgg	tacaaacctt	tcattgtaat	4380
ttttcagttt	tgataagtgc	ttgttagttt	atggaatctc	catatgttga	atttttgttt	4440

ES 2 470 440 B1

tgttttctgt	aggtttcaga	tgaaatttta	tttcagattt	accagccacg	ggagcccctt	4500
cacttcagca	aattttttaga	tccagacttt	cagccatctt	gttctgaggt	ggacctaata	4560
ggatttgctg	tttctgttgt	gaaaaaaaca	ggtaatgcac	aatatagtta	atttttttta	4620
ttgattcttt	taaaaaacat	tgtcttttaa	aatctcttat	gattagttag	agctaccagt	4680
tggcaaattt	gctagctaac	tagtgatctg	aaagtaagcc	tctttgaacc	tctgatttgg	4740
atcccagata	tctgggtgatc	ccgtacctgt	gtggaaggaa	gcaaccacca	ctctattttg	4800
tgcatcagat	gctaaagcat	atgatacaga	ggtacataat	gtttgggcca	cacatgccgg	4860
tgtacccaca	gaccccaacc	cacaagaagt	agtattggta	aatgtgacag	aaaattttta	4920
catgtggaaa	aatgacatgg	tagaacagat	gcatgaggat	ataatcagtt	tatgggatca	4980
aagcctaaag	ccatgtgtaa	aattaacccc	accctgtcca	aaggtatcct	ttgagccaat	5040
tcccatacat	tattgtgccc	cggctgggtt	tgcgattcta	aaatgtaata	ataagacggt	5100
caatggaaca	ggaccatgta	caaatgtcag	cacagtacaa	tgtacacatg	gaattaggcc	5160
agtagtatca	actcaactgc	tgtaaagtgg	cagtctagca	gaagaagagg	tagtaattag	5220
atctgtcaat	ttcacggaca	atgctaaaac	cataatagta	cagctgaaca	catctgtaga	5280
aattaattgt	acaagaccca	acaacaatac	aagaaaaaaa	atccgtatcc	agaggggacc	5340
agggagagca	tttgttacia	taggaaaaat	aggaaatatg	agacaagcac	attgtaacat	5400
tagtagagca	aaatggaatg	ccacttttaa	acagatagct	agcaaattaa	gagaacaatt	5460
tggaaataat	aaaacaataa	tctttaagca	atcctcagga	ggggaccag	aaattgtaac	5520
gcacagtttt	aattgtggag	gggaattttt	ctactgtaat	tcaacacaac	tgtttaatag	5580
tacttggttt	aatagtactt	ggagtactga	agggtcaa	aacactgaag	gaagtgacac	5640
aatcacactc	ccatgcagaa	taaaacaatt	tataaacatg	tggcaggaag	taggaaaagc	5700
aatgtatgcc	cctcccatca	gcggacaaat	tagatgttca	tcaaataatta	cagggctgct	5760
attaacaaga	gatggtggta	ataacaacaa	tgggtccgag	atcttcagac	ctggaggagg	5820
agatatgagg	gacaattgga	gaagtgaatt	atataaatat	aaagtagtaa	aaattgaacc	5880
attaggagta	gcaccaccca	aggcaaagag	aagagtgggtg	cagagagaaa	aaagagcagt	5940
gggaatagga	gctttgttcc	ttgggttctt	gggagcagca	ggaagcacta	tgggcgcagc	6000
gtcaatgacg	ctgacggtac	aggccagaca	attattgtct	ggtatagtgc	agcagcagaa	6060
caatttgctg	agggtctattg	aggcgcaaca	gcatctgttg	caactcacag	tctggggcat	6120
caagcagctc	caggcaagaa	tcctggctgt	ggaaagatac	ctaaaggatc	aacagctcct	6180
ggggatttgg	ggttgctctg	gaaaactact	ttgcaccact	gctgtgcctt	ggaatgctag	6240
ttggagtaat	aaatctctgg	aacagatttg	gaatcacacg	acgtggatgg	agtgggacag	6300
agaaattaac	aattacacaa	gcttaataca	ctccttaatt	gaagaatcgc	aaaaccagca	6360
agaaaagaat	gaacaagaat	tattggaatt	agataaatgg	gcaagtttgt	ggaattgggt	6420
taacataaca	aattggctgt	ggtatataaa	attattcata	atgatagtag	gaggcttggt	6480
aggtttaaga	atagtttttg	ctgtactttc	tgtagtgaat	agagttaggc	agggatattc	6540
accattatcg	tttcagacct	ggagatctcc	cgaggggacc	cgacaggccc	gaaggaatag	6600

ES 2 470 440 B1

aagaagaagg	tggagagaga	gacagagaca	gatccatttc	gaccaattca	ctcctcaggt	6660
gcaggctgcc	tatcagaagg	tgggtggctgg	tgtggccaat	gccctggctc	acaaatacca	6720
ctgagatcca	gacatgataa	gatacattga	tgagtttggga	caaaccacaa	ctagaatgca	6780
gtgaaaaaaaa	tgctttattt	gtgaaatttg	tgatgctatt	gctttatttg	taaccattat	6840
aagctgcaat	aaacaagtta	acaacaacaa	ttgcattcat	tttatgtttc	aggttcaggg	6900
ggagggtgtgg	gagggtttttt	aaagcaagta	aaacctctac	aaatgtggta	tggctgatta	6960
tgatccccag	gaagctcctc	tgtgtcctca	taaaccctaa	cctcctctac	ttgagaggac	7020
attccaatca	taggctgccc	atccaccctc	tgtgtcctcc	tgtaattag	gtcacttaac	7080
aaaaaggaaa	ttgggtaggg	gtttttcaca	gaccgctttc	taagggtaat	tttaaaatat	7140
ctgggaagtc	ccttccactg	ctgtgttcca	gaagtgttgg	taaacagccc	acaaatgtca	7200
acagcagaaa	catacaagct	gtcagctttg	cacaagggcc	caacaccctg	ctcatcaaga	7260
agcactgtgg	ttgctgtgtt	agtaatgtgc	aaaacaggag	gcacattttc	cccacctgtg	7320
taggttccaa	aatatctagt	gttttcatth	ttacttggat	caggaaccca	gcactccact	7380
ggataagcat	tatccttatc	caaaacagcc	ttgtgggtcag	tgttcatctg	ctgactgtca	7440
actgtagcat	tttttggggg	tacagtttga	gcaggatatt	tggtcctgta	gtttgctaac	7500
acaccccagg	tggcactttt	cgggggaaatg	tgcgcggaac	ccctatttgt	ttatttttct	7560
aaatacattc	aaatatgtat	ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	cttcaataat	7620
attgaaaaag	gaagagtatg	agtattcaac	atttccgtgt	cgcccttatt	cccttttttg	7680
cggcattttg	ccttcctgtt	tttgctcacc	cagaaacgct	ggtgaaagta	aaagatgctg	7740
aagatcagtt	gggtgcacga	gtgggttaca	tcgaactgga	tctcaacagc	ggtaagatcc	7800
ttgagagttt	tcgccccgaa	gaacgttttc	caatgatgag	cacttttaaa	gttctgctat	7860
gtggcgcggt	attatcccgt	attgacgccg	ggcaagagca	actcggtcgc	cgcatacact	7920
attctcagaa	tgacttgggt	gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	7980
tgacagtaag	agaattatgc	agtgtgtcca	taaccatgag	tgataaacact	gcggccaact	8040
tacttctgac	aacgatcggg	ggaccgaagg	agctaaccgc	ttttttgcac	aacatggggg	8100
atcatgtaac	tcgccttgat	cgttggggaa	cggagctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	8160
agcgtgacac	cacgatgcct	gtagcaatgg	caacaacggt	gcgcaaacta	ttactggcg	8220
aactacttac	tctagcttcc	cggcaacaat	taatagactg	gatggaggcg	gataaagttg	8280
caggaccact	tctgcgctcg	gcccttccgg	ctggctgggt	tattgctgat	aaatctggag	8340
ccggtgagcg	tgggtctcgc	ggtatcattg	cagcactggg	gccagatggg	aagccctccc	8400
gtatcgtagt	tatctacacg	acggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	aatagacaga	8460
tcgctgagat	agggtgcctca	ctgattaagc	attggtaact	gtcagaccaa	gtttactcat	8520
atatacttta	gattgattta	aaacttcatt	tttaatttaa	aaggatctag	gtgaagatcc	8580
tttttgataa	tctcatgacc	aaaatcctta	acgggtgagtt	ttcgttccac	tgagcgtcag	8640
accccgtaga	aaagatcaaa	ggatcttctt	gagatccttt	ttttctgcgc	gtaatctgct	8700

ES 2 470 440 B1

```

gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggtttg tttgccggat caagagctac      8760
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc      8820
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg      8880
ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt      8940
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt      9000
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgcgagc      9060
attgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca      9120
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata      9180
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg      9240
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct      9300
ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta      9360
ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag      9420
tgagcgagga agcgggaagag cgccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga      9480
ttcattaatg cag                                                                9493

```

<210> 83

<211> 7493

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..7493

<223> /mol_type="DNA"

/note="Minigen pSPL3b-MGBR2_EX21-24 con delección de 2000 pb en la
secuencia flanqueante del intrón 20 del gen BRCA2"
/organism="Artificial Sequence"

<220>

<221> misc_feature

<222> 1..7493

<223> /note="Minigen pSPL3b-MGBR2_EX21-24de12000"

<220>

<221> misc_feature

<222> join(1..1026,2739..7493)

<223> /note="Plásmido pSPL3b"

<220>

<221> misc_feature

<222> 1027..2738

<223> /note="Exones 21, 22, 23 y 24 y secuencias flanqueantes de los
intrones 20, 21, 22, 23 y 24 del gen BRCA2"

<400> 83

```

ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcca tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agcttggact gtgtttactt      360

```


ES 2 470 440 B1

gcaatcccc	aaaacagaca	gaatggtgca	tctgtccagt	gaggagaagt	ctgcggtcac	420
tgccctgtgg	ggcaagggtga	atgtggaaga	agttggtggt	gaggccctgg	gcaggctgct	480
ggttggtctac	ccatggaccc	agagggttctt	cgagtccttt	ggggacctgt	cctctgcaaa	540
tgctgttatg	aacaatccta	aggtgaaggc	tcatggcaag	aagggtgctgg	ctgccttcag	600
tgaggggtctg	agtcacctgg	acaacctcaa	aggcaccttt	gctaagctga	gtgaactgca	660
ctgtgacaag	ctgcacgctc	tagagtcgac	ccagcagtaa	gtaatacatg	taatgcaacc	720
tatacaaata	gcaatagtag	cattagtagt	agcaataata	atagcaatag	ttgtgtggtc	780
catagtaatc	atagaatata	ggaaaaatatt	aagacaaaga	aaaatagaca	ggttaattga	840
tagactaata	gaaagagcag	aagacagtgg	caatgagagt	gaaggagaaa	tatcagcact	900
tgtggagatg	gggggtggaga	tggggcacca	tgctccttgg	gatgttgatg	atctgtagtg	960
ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atgggggtacg	ggatcaccag	aattctggag	1020
ctcgagcctt	ctttgggtgt	tttatgcttg	gttcttttagt	tttagttgct	tttgaattta	1080
cagtttagtg	aattaataat	ccttttgttt	tcttagaaaa	cacaacaaaa	ccatatttac	1140
catcacgtgc	actaacaaga	cagcaagttc	gtgctttgca	agatgggtgca	gagctttatg	1200
aagcagtga	gaatgcagca	gacccagctt	accttgaggt	gagagagtaa	gaggacatat	1260
aatgaggctt	gatgattatt	caagggtgaga	agctgtttta	gactctctgg	ccatcacagg	1320
aaggagtatg	ttgaaatgct	gcatttctca	aaagggatgt	gtacatttct	gggattttca	1380
gtgatgtgcc	agacgagtgt	ggtggtatgt	tttcaactat	ataccgagta	gaggatggga	1440
gggttctaga	attttatata	ttaattaaat	ttggtttaaa	atgcaggcaa	aacttgtttt	1500
tagccatctg	taatgtagtt	ggtgatgatt	atgattatta	gagtacattt	ataattggag	1560
gatcattttt	gccgtaggga	aatagaatta	ttaatagttt	gaggcacctg	agaatattat	1620
gtgagaaaact	gattacatta	accacaccct	taagatgagc	tctaattttg	ttgtatttgt	1680
cctgttttaa	gccatctagt	tacaatagat	ggaacttttt	tgttctgatt	gctttttatt	1740
ccaatatctt	aaatgggtcac	agggttattt	cagtgaagag	cagttaagag	ccttgaataa	1800
tcacaggcaa	atgttgaaatg	ataagaaaca	agctcagatc	cagttggaaa	ttaggaaggc	1860
catggaatct	gctgaacaaa	aggaacaagg	tttatcaagg	gatgtcacia	ccgtgtggaa	1920
gttgcgatatt	gtaagctatt	caaaaaaaga	aaaagattca	ggtaagtatg	taaatgcttt	1980
gtttttatca	gtttttattaa	cttaaaaaat	gaccttacta	acaaaatgat	tataaatcca	2040
gataaagtat	aaagttagtt	tatatcagag	aagcaaaatc	cactactaat	gcccacaaag	2100
agataatata	aaagaggatc	tgtattttatt	ttgaaacaaa	cattttaaag	ataatcactt	2160
cttccattgc	atcttttctca	tcttttctcca	aacagttata	ctgagtattt	ggcgtccatc	2220
atcagattta	tattctctgt	taacagaagg	aaagagatac	agaatttatc	atcttgcaac	2280
ttcaaaatct	aaaagtaa	ctgaaagagc	taacatacag	ttagcagcga	caaaaaaac	2340
tcagtatcaa	caactaccgg	tacaaacctt	tcattgtaat	ttttcagttt	tgataagtgc	2400
ttgttagttt	atggaatctc	catatgttga	atttttgttt	tgttttctgt	aggtttcaga	2460
tgaaatttta	tttcagattt	accagccacg	ggagccccctt	cacttcagca	aattttttaga	2520

ES 2 470 440 B1

tccagacttt	cagccatcct	gttctgaggt	ggacctaata	ggatttgtcg	tttctgttgt	2580
gaaaaaaaca	ggtaatgcac	aatatagtta	atTTTTTTta	ttgattcttt	taaaaaacat	2640
tgtcttttaa	aatctcttat	gattagttag	agctaccagt	tggcaaattt	gctagctaac	2700
tagtgatctg	aaagtaagcc	tctttgaacc	tctgatttgg	atcccagata	tctggtgatc	2760
ccgtacctgt	gtggaaggaa	gcaaccacca	ctctatTTTT	tgcatacagat	gctaaagcat	2820
atgatacaga	ggtacataat	gtttgggcca	cacatgccgg	tgtaccacaca	gaccccaacc	2880
cacaagaagt	agtattggta	aatgtgacag	aaaattttta	catgtggaaa	aatgacatgg	2940
tagaacagat	gcatgaggat	ataatcagtt	tatgggatca	aagcctaaag	ccatgtgtaa	3000
aattaacccc	accctgtcca	aaggatatcct	ttgagccaat	tcccatacat	tattgtgccc	3060
cggctgggtt	tgcgattcta	aaatgtaata	ataagacggt	caatggaaca	ggaccatgta	3120
caaatgtcag	cacagtacaa	tgtacacatg	gaattaggcc	agtagtatca	actcaactgc	3180
tgttaaattg	cagtctagca	gaagaagagg	tagtaattag	atctgtcaat	ttcacggaca	3240
atgctaaaac	cataatagta	cagctgaaca	catctgtaga	aattaattgt	acaagacca	3300
acaacaatac	aagaaaaaaa	atccgtatcc	agaggggacc	aggagagca	tttgttacia	3360
taggaaaaat	aggaaatatg	agacaagcac	attgtaacat	tagtagagca	aatggaatg	3420
ccactttaaa	acagatagct	agcaaattaa	gagaacaatt	tggaaataat	aaaacaataa	3480
tctttaagca	atcctcagga	ggggacccag	aaattgtaac	gcacagtttt	aattgtggag	3540
gggaattttt	ctactgtaat	tcaacacaac	tgtttaatag	tacttggttt	aatagtactt	3600
ggagtactga	agggtcaaat	aacactgaag	gaagtgacac	aatcacactc	ccatgcagaa	3660
taaaacaatt	tataaacatg	tggcaggaag	taggaaaagc	aatgtatgcc	cctcccatca	3720
gcggacaaat	tagatgttca	tcaaataatta	cagggttgct	attaacaaga	gatggtggta	3780
ataacaacaa	tgggtccgag	atcttcagac	ctggaggagg	agatatgagg	gacaattgga	3840
gaagtgaatt	atataaatat	aaagtagtaa	aaattgaacc	attaggagta	gcaccacca	3900
aggcaaagag	aagagtgggtg	cagagagaaa	aaagagcagt	gggaatagga	gctttgttcc	3960
ttgggttctt	gggagcagca	ggaagcacta	tgggcgcagc	gtcaatgacg	ctgacggtac	4020
aggccagaca	attattgtct	ggtatagtgc	agcagcagaa	caatttgctg	agggtctattg	4080
aggcgcaaca	gcatctgttg	caactcacag	tctggggcat	caagcagctc	caggcaagaa	4140
tcctggctgt	ggaaagatac	ctaaaggatc	aacagctcct	ggggatttgg	ggttgctctg	4200
gaaaactact	ttgcaccact	gctgtgcctt	ggaatgctag	ttggagtaat	aatctcttgg	4260
aacagatttg	gaatcacacg	acgtggatgg	agtgggacag	agaaattaac	aattacacaa	4320
gcttaataca	ctccttaatt	gaagaatcgc	aaaaccagca	agaaaagaat	gaacaagaat	4380
tattggaatt	agataaatgg	gcaagtttgt	ggaattgggt	taacataaca	aattggctgt	4440
ggtatataaa	attattcata	atgatagtag	gaggcttggt	aggtttaaga	atagtttttg	4500
ctgtactttc	tgtagtgaat	agagttaggc	agggatattc	accattatcg	tttcagacct	4560
ggagatctcc	cgagggggacc	cgacaggccc	gaaggaatag	aagaagaagg	tggagagaga	4620

ES 2 470 440 B1

gacagagaca	gatccatttc	gaccaattca	ctcctcaggt	gcaggctgcc	tatcagaagg	4680
tgggtggctgg	tgtggccaat	gccctggctc	acaaatacca	ctgagatcca	gacatgataa	4740
gatacattga	tgagtttgga	caaaccacaa	ctagaatgca	gtgaaaaaaa	tgctttatnt	4800
gtgaaatttg	tgatgctatt	gctttatntg	taaccattat	aagctgcaat	aaacaagtta	4860
acaacaacaa	ttgcattcat	tttatgtttc	aggttcaggg	ggagggtgtg	gagggttttt	4920
aaagcaagta	aaacctctac	aaatgtggta	tggctgatta	tgatccccag	gaagctcctc	4980
tgtgtcctca	taaaccctaa	cctcctctac	ttgagaggac	attccaatca	taggctgccc	5040
atccaccctc	tgtgtcctcc	tgtaaatag	gtcacttaac	aaaaaggaaa	ttgggtaggg	5100
gtttttcaca	gaccgctttc	taagggtaat	tttaaaatat	ctgggaagtc	ccttccactg	5160
ctgtgttcca	gaagtgttgg	taaacagccc	acaaatgtca	acagcagaaa	catacaagct	5220
gtcagctttg	cacaagggcc	caacaccctg	ctcatcaaga	agcactgtgg	ttgtgtgttt	5280
agtaatgtgc	aaaacaggag	gcacattttc	cccacctgtg	taggttccaa	aatatctagt	5340
gttttcattt	ttacttggat	caggaacca	gcactccact	ggataagcat	tatccttatc	5400
caaaacagcc	ttgtggctag	tgttcatctg	ctgactgtca	actgtagcat	tttttggggg	5460
tacagtttga	gcaggatatt	tggctcctgta	gtttgctaac	acaccccagg	tggcactttt	5520
cgggggaaatg	tgcgcggaac	ccctatttgt	ttatttttct	aaatacattc	aaatatgtat	5580
ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	cttcaataat	attgaaaaag	gaagagtatg	5640
agtattcaac	atttccgtgt	cgcccttatt	cccttttttg	cggcattttg	ccttcctgtt	5700
tttgctcacc	cagaaacgct	ggtgaaagta	aaagatgctg	aagatcagtt	gggtgcacga	5760
gtgggttaca	tcgaactgga	tctcaacagc	ggtaagatcc	ttgagagttt	tcgccccgaa	5820
gaacgttttc	caatgatgag	cacttttaaa	gttctgctat	gtggcgcggt	attatcccgt	5880
attgacgccg	ggcaagagca	actcggtcgc	cgcatacact	attctcagaa	tgacttggtt	5940
gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	tgacagtaag	agaattatgc	6000
agtgtctgcca	taaccatgag	tgataacact	gcggccaact	tacttctgac	aacgatcgga	6060
ggaccgaagg	agctaaccgc	ttttttgcac	aacatggggg	atcatgtaac	tcgccttgat	6120
cgttggggaa	cggagctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	agcgtgacac	cacgatgcct	6180
gtagcaatgg	caacaacggt	gcgcaaaact	ttaactggcg	aactacttac	tctagcttcc	6240
cggcaacaat	taatagactg	gatggaggcg	gataaagttg	caggaccact	tctgcgctcg	6300
gcccttccgg	ctggctgggt	tattgctgat	aaatctggag	ccggtgagcg	tgggtctcgc	6360
ggatatcattg	cagcactggg	gccagatggg	aagccctccc	gtatcgtagt	tatctacacg	6420
acggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	aatagacaga	tcgctgagat	aggtgcctca	6480
ctgattaagc	attggtaact	gtcagaccaa	gtttactcat	atatacttta	gattgattta	6540
aaacttcatt	tttaatttaa	aaggatctag	gtgaagatcc	tttttgataa	tctcatgacc	6600
aaaatcctta	acgggtgagtt	ttcggtccac	tgagcgtcag	accccgtaga	aaagatcaaa	6660
ggatcttctt	gagatccttt	ttttctgcgc	gtaatctgct	gcttgcaaac	aaaaaaacca	6720
ccgctaccag	cggtggtttg	tttgccggat	caagagctac	caactctttt	tccgaaggta	6780

```

actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc      6840
caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca      6900
gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta      6960
ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag      7020
cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgcgagc attgagaaag cgccacgctt      7080
cccgaaggga gaaaggcgga caggatatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc      7140
acgaggggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac      7200
ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac      7260
gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc      7320
tttcctgcgt tatccccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat      7380
accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag      7440
cgccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cag              7493

```

```

<210> 84
<211> 8646
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..8646
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSPL3b clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24
      y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23
      y 24 del gen BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..8646
<223> /note="Minigen pSPL3b-MGBR2_EX19-24"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1026,3892..8646)
<223> /note="Plásmido pSPL3b"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 1026..3891
<223> /note="Exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24 y secuencias flanqueantes
de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 del gen BRCA2"

```

```

<400> 84
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggcctccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttattttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agcttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420

```

ES 2 470 440 B1

tgccctgtgg	ggcaagggtga	atgtggaaga	agttggtggt	gaggccctgg	gcaggctgct	480
ggttgtctac	ccatggaccc	agaggttctt	cgagtccttt	ggggacctgt	cctctgcaaa	540
tgctgttatg	aacaatccta	aggtgaaggc	tcatggcaag	aagggtgctgg	ctgccttcag	600
tgaggggtctg	agtcacctgg	acaacctcaa	aggcaccttt	gctaagctga	gtgaactgca	660
ctgtgacaag	ctgcacgctc	tagagtcgac	ccagcagtaa	gtaatacatg	taatgcaacc	720
tatacaaata	gcaatagtag	cattagtagt	agcaataata	atagcaatag	ttgtgtggtc	780
catagtaatc	atagaatata	ggaaaatatt	aagacaaaga	aaaatagaca	ggttaattga	840
tagactaata	gaaagagcag	aagacagtgg	caatgagagt	gaaggagaaa	tatcagcact	900
tgtggagatg	gggggtggaga	tggggcacca	tgctccttgg	gatgttgatg	atctgtagtg	960
ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atgggggtacg	ggatcaccag	aattctggag	1020
ctcgagcaca	catccggaat	agcattaaga	acttgtagca	gtataaacia	tatgtttgag	1080
aagtactata	ttgtgaaaat	atcttcactt	ttatacagtt	ttttacttat	ttactgtctt	1140
actaatcttc	ctaagacttt	ttaaagtga	tatttttaag	gcagttctag	aagaatgaaa	1200
actcttatga	tatctgtaat	agaattgaat	acatatatta	ctactaaatc	aatatattta	1260
ttaatttgct	cagattttctg	ctaacagtac	tcggcctgct	cgctgggtata	ccaaacttgg	1320
attctttcct	gaccctagac	cttttcctct	gcccttatca	tcgcttttca	gtgatggagg	1380
aatgtttggt	tgtgttgatg	taattattca	aagagcatac	cctatacagg	tatgatgtat	1440
tcttgaaact	taccatata	ttctttcttt	tgatacaatt	aatttgtttg	tttgtttgag	1500
atggagtttc	ggtctcttgc	ccaggctgga	gtgcaatggc	gtgatcttgg	ttcactgcag	1560
cctccacctc	ccgggttcaa	gtgattctcc	tgccctagcc	tctcaagtag	ctgagccacc	1620
acacctggct	aattttgtat	ttttggtaga	gaaggggttt	catcatgttg	gtcaggctga	1680
tctcgaactc	ctgacctcag	gtgatccact	aatctcagcc	tcccaaagtt	ctgggattac	1740
agatgtgagc	cactgtgcct	ggcctgatac	aattaacttg	aatgttatat	atgtgacttt	1800
tttggtgtgt	gtaacacatt	attacagtgg	atggagaaga	catcatctgg	attatacata	1860
tttcgcaatg	aaagagagga	agaaaaggaa	gcagcaaaat	atgtggaggc	ccaacaaaag	1920
agactagaag	ccttattcac	taaaattcag	gaggaaattg	aagaacatga	aggtaaaatt	1980
agttatatgg	tacacattgt	tatttcta	atgagaacia	agtcttagag	actttgaatt	2040
taacattttt	aatgagtaaa	ttgtttttat	tttgagtagt	aaattgactt	tatttttttag	2100
tatctagggg	attctttttt	ggtgttagac	aaagaatagc	aacaagggac	agaaatatca	2160
ggtctaagcc	atttgtaatc	cttctttggg	tgttttatgc	ttggttcttt	agtttttagtt	2220
gcttttgaat	ttacagttta	gtgaattaat	aatccttttg	ttttcttaga	aaacacaaca	2280
aaaccatatt	taccatcacg	tgcactaaca	agacagcaag	ttcgtgcttt	gcaagatggt	2340
gcagagcttt	atgaagcagt	gaagaatgca	gcagaccag	cttaccttga	ggtgagagag	2400
taagaggaca	tataatgagg	cttgatgatt	attcaagggtg	agaagctggt	ttagactctc	2460
tggccatcac	aggaaggagt	atgttgaaat	gctgcatttc	tcaaaaggga	tgtgtacatt	2520
tctgggattt	tcagtgatgt	gccagacgag	tgtgggtggt	tgttttcaac	tatataccga	2580

ES 2 470 440 B1

gtagaggatg	ggaggggttct	agaattttat	atattaatta	aatttggttt	aaaatgcagg	2640
caaaacttgt	ttttagccat	ctgtaatgta	gttggtgatg	attatgatta	ttagagtaca	2700
tttataattg	gaggatcatt	tttgccgtag	ggaaatagaa	ttattaatag	tttgaggcac	2760
ctgagaatat	tatgtgagaa	actgattaca	ttaaccacac	ccttaagatg	agctctaatt	2820
ttgttgtatt	tgtcctgttt	aaagccatct	agttacaata	gatggaactt	ttttgttctg	2880
attgcttttt	attccaatat	cttaaatggt	cacagggtta	tttcagtgaa	gagcagttaa	2940
gagccttgaa	taatcacagg	caaatgttga	atgataagaa	acaagctcag	atccagttgg	3000
aaattaggaa	ggccatggaa	tctgctgaac	aaaaggaaca	aggtttatca	agggatgtca	3060
caaccgtgtg	gaagttgcgt	attgtaagct	attcaaaaaa	agaaaaagat	tcaggtaagt	3120
atgtaaatgc	tttggttttta	tcagttttat	taacttaaaa	aatgacctta	ctaacaaaat	3180
gattataaat	ccagataaag	tataaagtta	gtttatatca	gagaagcaaa	atccactact	3240
aatgcccaca	aagagataat	ataaaaagagg	atctgtattt	attttgaaac	aaacatttaa	3300
atgataatca	cttcttccat	tgcattcttc	tcattctttct	ccaaacagtt	atactgagta	3360
tttggcgtcc	atcatcagat	ttatattctc	tgtaaacaga	aggaaagaga	tacagaattt	3420
atcatcttgc	aacttcaaaa	tctaaaagta	aatctgaaag	agctaacata	cagttagcag	3480
cgacaaaaaa	aactcagtat	caacaactac	cggtaacaaac	ctttcattgt	aatttttcag	3540
ttttgataag	tgcttggttag	tttatggaat	ctccatatgt	tgaatttttg	ttttgttttc	3600
tgtaggtttc	agatgaaatt	ttatttcaga	tttaccagcc	acgggagccc	cttcacttca	3660
gcaaattttt	agatccagac	tttcagccat	cttgttctga	ggtaggaccta	ataggatttg	3720
tcgtttctgt	tgtgaaaaaa	acaggtaatg	cacaatatag	ttaatttttt	ttattgattc	3780
ttttaaaaaa	cattgtcttt	taaaatctct	tatgattagt	tggagctacc	agttggcaaa	3840
tttgctagct	aactagtgat	ctgaaagtaa	gcctctttga	acctctgatt	tggatcccag	3900
atatctgggtg	atcccgtacc	tgtgtggaag	gaagcaacca	ccactctatt	ttgtgcatca	3960
gatgctaaag	catatgatac	agaggtagat	aatgtttggg	ccacacatgc	cgggtgtaccc	4020
acagacccca	accacaaga	agtagtattg	gtaaagtgtg	cagaaaattt	taacatgtgg	4080
aaaaatgaca	tggtagaaca	gatgcatgag	gatataatca	gtttatggga	tcaaagccta	4140
aagccatgtg	taaaattaac	cccaccctgt	ccaaaggtat	cctttgagcc	aattcccata	4200
cattattgtg	ccccggctgg	ttttgctgatt	ctaaaatgta	ataataagac	gttcaatgga	4260
acaggaccat	gtacaaatgt	cagcacagta	caatgtacac	atggaattag	gccagtagta	4320
tcaactcaac	tgctgttaaa	tggcagtcta	gcagaagaag	aggtagtaat	tagatctgtc	4380
aatttcacgg	acaatgctaa	aaccataata	gtacagctga	acacatctgt	agaaattaat	4440
tgtacaagac	ccaacaacaa	tacaagaaaa	aaaatccgta	tccagagggg	accagggaga	4500
gcatttggtta	caataggaaa	aataggaaat	atgagacaag	cacattgtaa	cattagtaga	4560
gcaaaatgga	atgccacttt	aaaacagata	gctagcaaat	taagagaaca	atgtggaaat	4620
aataaaacaa	taatctttta	gcaatcctca	ggagggggacc	cagaaattgt	aacgcacagt	4680

ES 2 470 440 B1

tttaattgtg	gaggggaatt	tttctactgt	aattcaacac	aactgtttaa	tagtacttgg	4740
tttaatagta	cttggagtac	tgaaggggtca	aataacactg	aaggaagtga	cacaatcaca	4800
ctcccatgca	gaataaaaaca	atttataaaac	atgtggcgagg	aagtaggaaa	agcaatgtat	4860
gccccctccca	tcagcgggaca	aattagatgt	tcaccaaata	ttacagggct	gctattaaca	4920
agagatggtg	gtaataacaa	caatgggtcc	gagatcttca	gacctggagg	aggagatatg	4980
agggacaatt	ggagaagtga	attatataaa	tataaagtag	taaaaattga	accattagga	5040
gtagcaccca	ccaaggcaaa	gagaagagtg	gtgcagagag	aaaaaagagc	agtgggaata	5100
ggagctttgt	tccttggggtt	cttggggagca	gcaggaagca	ctatggggcg	agcgtcaatg	5160
acgctgacgg	tacaggccag	acaattattg	tctggtatag	tgcagcagca	gaacaatttg	5220
ctgaggggcta	ttgagggcgca	acagcatctg	ttgcaactca	cagtctgggg	catcaagcag	5280
ctccaggcaa	gaatcctggc	tgtggaaaga	tacctaaagg	atcaacagct	cctggggatt	5340
tgggggttgct	ctggaaaact	actttgcacc	actgctgtgc	cttggaatgc	tagttggagt	5400
aataaatctc	tggaacagat	ttggaatcac	acgacgtgga	tggagtggga	cagagaaatt	5460
aacaattaca	caagcttaat	acactcctta	attgaagaat	cgcaaaacca	gcaagaaaag	5520
aatgaacaag	aattattgga	attagataaa	tgggcaagtt	tgtggaattg	gtttaacata	5580
acaaattggc	tgtggtatat	aaaattattc	ataatgatag	taggaggctt	ggtaggttta	5640
agaatagttt	ttgctgtact	ttctgtagtg	aatagagtta	ggcagggata	ttcaccatta	5700
tcgtttcaga	cctggagatc	tcccggaggg	acccgacagg	cccgaaggaa	tagaagaaga	5760
aggtggagag	agagacagag	acagatccat	ttcgaccaat	tcactcctca	ggtgcaggct	5820
gcctatcaga	aggtgggtggc	tgggtgtggcc	aatgccctgg	ctcaciaaata	ccactgagat	5880
ccagacatga	taagatacat	tgatgagttt	ggacaaaacca	caactagaat	gcagtgaaaa	5940
aaatgcttta	tttgtgaaat	ttgtgatgct	attgctttat	ttgtaaccat	tataagctgc	6000
aataaacaag	ttaacaacaa	caattgcatt	cattttatgt	ttcagggttca	gggggaggtg	6060
tgggaggttt	tttaaagcaa	gtaaaacctc	tacaaatgtg	gtatggctga	ttatgatccc	6120
caggaagctc	ctctgtgtcc	tcataaaccc	taacctcctc	tacttgagag	gacattccaa	6180
tcataggctg	cccattccacc	ctctgtgtcc	tcctgttaat	taggtcactt	aacaaaaagg	6240
aaattgggta	gggggtttttc	acagaccgct	ttctaagggt	aatttttaaaa	tatctgggaa	6300
gtcccttcca	ctgctgtgtt	ccagaagtgt	tggtaaacag	cccacaaatg	tcaacagcag	6360
aaacatacaa	gctgtcagct	ttgcacaagg	gccaacacc	ctgctcatca	agaagcactg	6420
tggttgctgt	gttagtaatg	tgcaaaacag	gaggcacatt	ttccccacct	gtgtaggttc	6480
caaaatatct	agtgttttca	tttttacttg	gatcaggaac	ccagcactcc	actggataag	6540
cattatcctt	atccaaaaca	gccttgtggg	cagtgttcat	ctgctgactg	tcaactgtag	6600
catttttttg	ggttacagtt	tgagcaggat	atttgggtcct	gtagtttgct	aacacacccc	6660
aggtggcact	tttcgggggaa	atgtgcgcgg	aacccctatt	tgtttatattt	tctaaataca	6720
ttcaaatatg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	aatattgaaa	6780
aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	tgtcgccttt	attccctttt	ttgcggcatt	6840

ES 2 470 440 B1

ttgccttcct	gtttttgctc	acccagaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	ctgaagatca	6900
gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	agcggtaaga	tccttgagag	6960
ttttcgcccc	gaagaacggt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagttctgc	tatgtggcgc	7020
ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggg	cgccgcatac	actattctca	7080
gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	gcatgacagt	7140
aagagaatta	tgcagtgctg	ccataacccat	gagtataaac	actgcggcca	acttacttct	7200
gacaacgatc	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	gggatcatgt	7260
aactcgccct	gatcggtggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacg	acgagcgtga	7320
caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	gcgaactact	7380
tactctagct	tcccggcaac	aattaataga	ctggatggag	gcggataaag	ttgcaggacc	7440
acttctgcgc	tcggcccttc	cggctggctg	gtttattgct	gataaatctg	gagccggtga	7500
gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	cccgtatcgt	7560
agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	agatcgctga	7620
gatagggtgcc	tactgatta	agcattggta	actgtcagac	caagtttact	catatatact	7680
ttagattgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga	tcctttttga	7740
taatctcatg	accaaaatcc	ttaacgggtga	gttttcgttc	actgagcgt	cagaccccgt	7800
agaaaagatc	aaaggatcct	cttgagatcc	tttttttctg	cgcgtaatct	gctgcttgca	7860
aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgg	ttgtttgccg	gatcaagagc	taccaactct	7920
ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	ttctagtgtg	7980
gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	tcgctctgct	8040
aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	ggttggaactc	8100
aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	acgggggggt	cgtgcacaca	8160
gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	ctacagcgcg	agcattgaga	8220
aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacagggtat	ccggtaagcg	gcaggggtcgg	8280
aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	atagtcctgt	8340
cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atttttgtga	tgctcgtcag	gggggaggag	8400
cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	ctggcctttt	gctggccttt	8460
tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	ttaccgcctt	8520
tgagtgagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgagcgcagt	cagtgcgcga	8580
ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	gcgcgttggc	cgattcatta	8640
atgcag						8646

<210> 85

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source


```

<222> 1..12
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del extremo 5' del cebador de amplificación del
      casete lacZ que comprende un sitio de restricción MuiI"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 7..12
<223> /note="Sitio de restricción MuiI"

<400> 85
cacacacaat tg                                     12

<210> 86
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..12
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del extremo 5' del cebador de amplificación del
      casete lacZ que comprende un sitio de restricción NdeI"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 7..12
<223> /note="Sitio de restricción NdeI"

<400> 86
cacacacata tg                                     12

<210> 87
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..38
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para eliminar un sitio críptico aceptor de
      splicing de lacZ"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 18
<223> /note="b se selecciona entre c, t o g, y preferentemente es t"

<400> 87
cagcttttgt tccctttbgt gagggttaat tgcgcgct       38

<210> 88
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..38
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para eliminar un sitio críptico de splicin
      g de lacZ"
      /organism="Artificial Sequence"

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 21
<223> /note="v se selecciona entre a, c o g, y preferentemente es a"

<400> 88
agcgcgcaat taaccctcac vaaaggggaac aaaagctg 38



②① N.º solicitud: 201231427

②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.09.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/85** (2006.01)
C12Q1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	DESVIAT, L.R. et al., 'Minigenes to confirm exon skipping mutations', METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Abr 2012, Vol. 867, Páginas 37-47, ISSN: 1940-6029 (Electronic), doi: 10.1007/978-1-61779-767-5_3,: Materiales; Métodos, Figuras 1 y 2.	1-29
Y	BURN, T.C. et al., 'Increased exon-trapping efficiency through modifications to the pSPL3 splicing vector', GENE, 1995, Vol.161, No. 2, Páginas 183-187, ISSN: 0378-1119, Experimental y Discusión, Figuras 1 y 2.	1-29
Y	DATSON, N.A. et al., 'Specific isolation of 3'-terminal exons of human genes by exon trapping', NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 1994, Vol. 22, No. 20, Páginas 4148-4153, ISSN: 0305-1048, Materiales y Métodos, Figura 1.	1-29
Y	DUYK, G.M. et al., 'Exon trapping: a genetic screen to identify candidate transcribed sequences in cloned mammalian genomic DNA', PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE U S A., 1990, Vol. 87, No. 22, Páginas 8995-8999, ISSN: 0027-8424 (Print), Materiales y Métodos, Resultados, Figura 1 y 2.	1-29
A	ACEDO, A. et al., 'Comprehensive splicing functional analysis of DNA variants of the BRCA2 gene by hybrid minigenes', BREAST CANCER RESEARCH, 2012 Mayo, Vol. 14, No. 3, Página R87, ISSN: 1465-5411 (print), ISSN: 1465-542X (electronic), todo el documento.	1-29
A	SANZ, D.J. et al., 'A high proportion of DNA variants of BRCA1 and BRCA2 is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients', CLINICAL CANCER RESEARCH, 2010 Mar, Vol. 16, No. 6, Páginas 1957-1967, ISSN: 1078-0432 (print), todo el documento.	1-29
A	BONNET, C. et al., 'Screening BRCA1 and BRCA2 unclassified variants for splicing mutations using reverse transcription PCR on patient RNA and an ex vivo assay based on a splicing reporter minigene', JOURNAL OF MEDICAL GENETICS, 2008, Vol. 45, No. 7, Páginas 438-446, ISSN: 0022-2593 (print), ISSN: 1468-6244 (electronic), doi: 10.1136/jmg.2007.056895, todo el documento.	1-29
A	GAILDRAT, P. et al., 'Use of splicing reporter minigene assay to evaluate the effect on splicing of unclassified genetic variants', METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2010, Vol. 653, Páginas 249-257, ISSN: 1940-6029 (Electronic), doi: 10.1007/978-1-60761-759-4_15, todo el documento.	1-29

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.06.2014

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/6



- ②① N.º solicitud: 201231427
②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.09.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/85** (2006.01)
C12Q1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2008095712 A1 (KUROYANAGI, H. et al.) 24.04.2008, todo el documento.	1-29
A	GURSKAYA, N.G. et al, 'Analysis of alternative splicing of cassette exons at single-cell level using two fluorescent proteins', NUCLEIC ACIDS RES., 2012 Abr, Vol. 40, No. 8, Página e57, ISSN: 0305-1048 (print), ISSN: 1362-4962 (electronic), doi: 10.1093/nar/gkr1314, todo el documento.	1-29

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.06.2014

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/6

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.06.2014

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-29
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones
Reivindicaciones 1-29

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DESVIAT, L.R. et al., <i>Methods Mol. Biol.</i> , (2012 Abr), <u>867</u> : 37-47.	2012 Abr
D02	BURN, T.C. et al., <i>Gene</i> , (1995), <u>161</u> (2): 183-7.	1995
D03	DATSON, N.A. et al., <i>Nucleic Acids Res.</i> , (1994), <u>22</u> (20): 4148-4153.	1994
D04	DUYK, G.M. et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.</i> , (1990), <u>87</u> (22): 8995-9.	1990
D05	ACEDO, A. et al., <i>Breast Cancer Res.</i> , (2012 Mayo), <u>14</u> (3):R87.	2012 Mayo
D06	SANZ, D.J. et al., <i>Clin. Cancer Res.</i> , (2010 Mar), <u>16</u> (6): 1957-67.	2010
D07	BONNET, C. et al., <i>J. Med. Genet.</i> , (2008), <u>45</u> (7): 438-46.	2008
D08	GAILDRAT, P. et al., <i>Methods Mol. Biol.</i> , (2010), <u>653</u> :249-57.	2010
D09	US 2008095712 A1 (KUROYANAGI, H. et al.)	24.04.2008
D10	GURSKAYA, N.G. et al, <i>Nucleic Acids Res.</i> , (2012 Abr), <u>40</u> (8): e57.	2012 Abr

En D1-D10 se divulgan diferentes plásmidos o vectores útiles para la identificación de exones potenciales ('exon trapping vector').

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).****1.1 Reivindicaciones independientes 1, 24 y 29.**

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un vector génico, derivado del plásmido pSPL3b (SEQ ID No:1), útil para ensayos funcionales del procesamiento del pre-ARNm ('splicing') caracterizado porque comprende las siguientes modificaciones en la secuencia de pSPL3b: (a) una delección de al menos 1,2 Kb en el intrón de pSPL3b, (b) la sustitución del sitio de clonación múltiple (MCS) de pSPL3b por un casete *lacZ* que comprende una mutación de eliminación de un primer sitio crítico aceptor de 'splicing', (c) una mutación de fortalecimiento de un segundo sitio aceptor de 'splicing' y (d) al menos una mutación de inhabilitación de un sitio de restricción. Las reivindicaciones 24 y 29 tratan de un procedimiento de obtención del vector génico de la reivindicación 1 y de un procedimiento para el ensayo funcional de 'splicing' basado en el uso del vector de la reivindicación 1.

En el estado de la técnica se ha divulgado el uso de vectores génicos para ensayos funcionales de 'splicing' (cf: D01-D10). Sin embargo, ninguno de tales vectores comparte las características técnicas del reivindicado en la solicitud de patente.

Por consiguiente, el objeto de protección de las reivindicaciones independientes 1, 24 y 29, y el de las dependientes 2-23, 25-28 se considera que es nuevo sobre la base de los documentos D01-D10.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-29 es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).**2.1. Reivindicaciones independientes 1, 24 y 29.**

2.1.1. Los documentos D01-D04 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D01-D02 se divulga el uso de minigenes (vector pSPL3) en ensayos funcionales de 'splicing' y el plásmido pSPL3b derivado de pSPL3. En D03-D04 se describe un vector para la clonación e identificación de exones que comprende el exón 1 de β -globina humana, el gen *lacZ* y un sitio de clonación múltiple (MSC) (cf. D01: Materiales; Métodos, Figuras 1 y 2. D02: Experimental y Discusión, Figuras 1 y 2. D03: Materiales y Métodos, Figura 1. D04: Materiales y Métodos, Resultados, Figura 1 y 2).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevos vectores útiles para ensayos funcionales de 'splicing' que permitan clonar fragmentos de ADN de mayor tamaño, minimizar los productos de 'splicing' inespecíficos e identificar más fácilmente los clones que contienen un inserto de ADN (cf. Página 3, líneas 18-22).

2.1.3. La solución propuesta en la reivindicación 1 consiste en un vector derivado del plásmido pSPL3b (cf. D02) caracterizado básicamente por sustituir el MSC original del intrón de pSPL3b por un casete *lacZ* constituido por el gen *LacZα* (SEQ ID No: 2) o por *LacZα* y un MSC (SEQ ID No: 21), y por reducir el tamaño del intrón de pSPL3b mediante una delección de al menos 1,2 Kb. Además, se introducen cambios puntuales en la secuencia del intrón que conllevan la inhabilitación de sitios de restricción, así como, la eliminación o el fortalecimiento de sitios aceptores de 'splicing'. Según la descripción, la introducción del casete *LacZ* en los vectores reivindicados mejora la capacidad de selección de los clones recombinantes portadores de un vector con un fragmento de ADN insertado en el casete *LacZ*, pues estos clones son de color blanco en presencia de X-Gal e IPTG frente al color azul de los clones no recombinantes. Por otro lado, la delección de al menos 1,2 Kb de pSPL3b permite la clonación de insertos de mayor tamaño y los cambios puntuales que afectan a sitios de restricción y a sitios aceptores de 'splicing' generan sitios únicos de clonación y minimizan la aparición de los productos de 'splicing' inespecíficos (cf. Página 8, líneas 15-30).

En D02 se describe el plásmido pSPL3b derivado de pSPL3 que comprende unas modificaciones en su secuencia que minimizan los productos de 'splicing' inespecíficos del primero (cf D02: 'Experimental and Discussion', Figuras 1 y 2). En los documentos D03-D04 se divulga un vector génico para la clonación de exones que comprende un único sitio donador de 'splicing', seguido del gen *lacZα* y de un MSC. Este vector permite identificar exones internos y/o externos insertados en el MSC, mediante la selección de colonias blancas en presencia de X-Gal e IPTG (cf. D03: Materiales y Métodos, Figura 1. D04: Materiales y Métodos, Resultados, Figuras 1 y 2). En cuanto a la reducción del tamaño de un vector mediante la delección de un fragmento del mismo para favorecer la clonación de fragmentos de mayor tamaño es una técnica ampliamente descrita y utilizada en el estado de la técnica.

Por consiguiente, ante el problema técnico planteado, el experto en la materia combinaría los conocimientos divulgados en D01-D02 y D03-D04 que, junto a los de D05-D10, le llevarían a la solución propuesta en la reivindicación 1 o a una equivalente. Por todo ello, se considera que la reivindicación 1 y las reivindicaciones dependiente 2-23, 27 y 28 no son inventivas. Análogamente, las reivindicaciones independientes 24 y 29 que tratan del procedimiento de obtención del vector de la invención y de un procedimiento para el ensayo funcional de 'splicing' basado en el uso del mismo y sus reivindicaciones dependientes 25-26, se consideran no inventivas sobre la base de los documentos D01-D10.

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-29 no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.